

EDILMERE REGINA SPRADA MAIA

**CULTIVO DE CÉLULAS DA RETINA DE PEIXES
ANTÁRTICOS DA FAMÍLIA *Nototheniidae*
EM MEIOS DE CULTURA SUPLEMENTADOS
COM DIFERENTES FATORES DE CRESCIMENTO**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre. Área de Zootecnia de Produtos Aquáticos Renováveis: Sub – Área Fisiopatologia e Comportamento de Organismos Aquáticos do Curso de Pós – Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná.

**CURITIBA
2000**

EDILMERE REGINA SPRADA MAIA

**CULTIVO DE CÉLULAS DA RETINA DE PEIXES
ANTÁRTICOS DA FAMÍLIA *Nototheniidae*
EM MEIOS DE CULTURA SUPLEMENTADOS
COM DIFERENTES FATORES DE CRESCIMENTO**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre.
Área de Zootecnia de Produtos Aquáticos Renováveis: Sub – Área Fisiopatologia e Comportamento de Organismos Aquáticos do Curso de Pós – Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná.

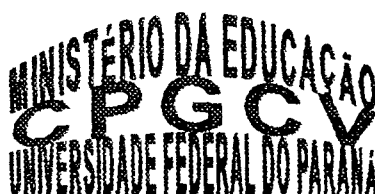
Orientador: Prof. Dr. Metry Bacila

Co - Orientadores:

Prof^a. Dra. Helena C. da Silva de Assis

Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes

**CURITIBA
2000**



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa de Tese da Candidata ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área Produção Animal **EDILMERE SREGINA SPRADA MAIA** após a realização desse evento, exarou o seguinte Parecer:

1) A Tese, intitulada **“CULTIVO DE CÉLULAS DA RETINA DE PEIXES ANTÁRTICOS DA FAMÍLIA *Nototheniidae* EM MEIOS DE CULTURA SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FATORES DE CRESCIMENTO”** foi considerada, por todos os Examinadores, como um louvável trabalho, encerrando resultados que representam importante progresso na área de sua pertinência.

2) A Candidata se houve muito bem durante a Defesa de Tese, respondendo a todas as questões que foram colocadas.

Assim, a Comissão Examinadora, ante os méritos demonstrados pela Candidata, atribuiu o conceito “A” concluindo que faz jus ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área de Produção Animal.

Curitiba, 25 de julho de 2000.



Prof. Dr. METRY BACILA
Presidente/Orientador



Prof. Dr. LUIZ CLÁUDIO FERNANDES
Membro



Profa. Dra. HELENA CRISTINA DA SILVA DE ASSIS
Membro

*Aos meus filhos **Giuliana** e
Vintcius pelo carinho e amor que
me dedicaram em mais esta
jornada.*

*À minha **Mãe**, ao **Alexandre**
e a todos os meus **familiares**,*

*A **DEUS** pelo apoio infinito.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Metry Bacila, por sua orientação e exemplo de dedicação científica, além da sua grande consideração com que sempre me recebeu, enfim, por nossa amizade e confiança.

À Professora Dra. Helena Cristina da Silva de Assis, antes de tudo uma grande amiga, obrigada pela sua dedicação, carinho e pelo apoio em mais uma fase compartilhada.

Ao Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes, por sua compreensão, incentivo e consideração que sempre teve para comigo.

Ao Prof. Dr. Waldemiro Gremski, por ter me ensinado Citologia de uma maneira contagiante, fez de meu futuro uma célula em cultivo.

Ao Prof. Dr. Heitor Guilherme Segundo Medina, meu grande mestre.

Às amigas Cleoni Santos Carvalho por toda força e alegria que compartilhamos e Selma M. Tayamichi pela ajuda fotográfica.

À Deleuse Cherobim, ex- funcionária do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias pela atenção e compreensão.

Ao Instituto de Tecnologia do Paraná - TECPAR, especialmente aos profissionais do Laboratório de Cultivo Celular: Beatriz César, Francolino Cardoso, Eduardo Discher Vieira e Maria Helena Silveira de Carvalho, pela nossa eterna amizade e pelo carinho com que me receberam no laboratório.

À Maria Paula Assis Yamada, do Instituto de Tecnologia do Paraná, pela oportunidade de desenvolver parte da minha tese nos laboratórios de Cultivo Celular e por toda nossa amizade.

Ao Prof. Dr. Rui Curi, do Laboratório de Fisiologia da Universidade de São Paulo, pela atenção amiga e dedicada e por sua contribuição em aspectos importantes e indispensáveis.

À Dra. Oraide Maria Woehl, pela colaboração e pela jornada durante a XVI Expedição Antártica Brasileira.

À Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela concessão da Bolsa de Mestrado, a qual possibilitou a execução da parte experimental do projeto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa, da qual esta dissertação é parte integrante.

Ao Programa Antártico Brasileiro (PROANTAR) e à Comissão Interministerial para os Recursos do Mar (CIRM), e a todos os que, de alguma forma, prestaram sua colaboração para que alcançássemos nossos objetivos na Antártica.

Ao Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná por terem me acolhido no final do desenvolvimento prático de minhas pesquisas e por toda nossa grande amizade.

Ao Setor de Ciências Agrárias, ao Departamento de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Paraná, e por todos os amigos que conquistei, obrigado, pela pronta acolhida com que me receberam para realizar meu Mestrado.

A todos aqueles que tenham colaborado para a realização deste trabalho e que involuntariamente não mencionei.

A DEUS, meu infinito amigo e conselheiro....

“Não basta investigar fenômenos, aderir verbalmente, melhorar a estatística e conquistar favores de opinião, por mais respeitáveis que sejam. É indispensável cogitar do conhecimento, de nossos infinitos potenciais nunca atingidos, aplicando-os, por sua vez, nos serviços do bem, da ciência e da vida.”

(Autor desconhecido)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - MATERIAL E MÉTODOS	14
2.1. MATERIAL BIOLÓGICO	14
2.2. MEIOS DE CULTURA E SUPLEMENTOS	14
2.3. EQUIPAMENTOS E MATERIAL DE LABORATÓRIO	15
2.4. MÉTODOS	16
2.4.1 Obtenção da retina e cultivo em monocamada	16
2.4.2 Congelamento Celular	17
2.4.3 Descongelação Celular	18
2.4.4 Subculturas	18
2.4.5 Determinação da viabilidade celular com “Trypan Blue” após o descongelamento	19
2.4.6 Concentração protéica do humor vítreo	20
2.4.7 Análise estatística	20
3 - RESULTADOS	28
3.1. Efeito da temperatura sobre o cultivo <i>in vitro</i> das células da retina de peixes	28
3.2. Efeito dos meios de cultura e de suplementos nutricionais sobre as células da retina de peixes antárticos	28
3.3. Concentração protéica do humor vítreo de peixes antárticos...	30

3.4.	Viabilidade das células da retina do peixe <i><u>Notothenia neglecta</u></i> frente aos diferentes meios e suplementos utilizados.....	30
3.5.	Viabilidade das células da retina do peixe <i><u>Trematomus newnesi</u></i> frente aos diferentes meios e suplementos utilizados.....	32
3.6.	Viabilidade das células da retina do peixe <i><u>Nototheniops nudifrons</u></i> frente aos diferentes meios e suplementos utilizados	32
4 -	DISCUSSÃO	44
5 -	CONCLUSÕES	50
6 -	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.	Mapa da Baía do Almirantado, Arquipélagos das Shetland do Sul, Ilha Rei George, Antártica e Estação Antártica Comandante Ferraz	10
Figura 2.	Peixes antárticos estudados no presente trabalho: <u><i>Notothenia neglecta</i></u> , <u><i>Nototheniops nudifrons</i></u> , <u><i>Trematomus newnesi</i></u>	11
Figura 3.	Secção diagramática do olho de peixe da família <i>Nototheniidae</i>	12
Figura 4.	Laboratórios de realização experimental do presente projeto	13
Figura 5.	Principais etapas do cultivo de células da retina de peixes <i>in vitro</i>	26
Figura 6.	Diagrama representativo das etapas executadas no projeto	27
Figura 7.	Efeito da temperatura sobre o cultivo primário de células da retina de peixes antárticos cultivados após 24 horas de cultivo em meio 199 contendo 2% de soro fetal bovino	35

Figura 8.	Efeito dos diferentes meios de cultura suplementados com 2% de soro fetal bovino (SFB) e 2% de humor vítreo (HV) sobre células da retina de peixes antárticos, após 24 horas de cultivo <i>in vitro</i> . Fase I - Estação Antártica Comandante Ferraz	36
Figura 9.	Concentração protéica do humor vítreo de diferentes espécies de peixes antárticos	37
Figura 10.	Efeito dos meios de cultura 199, L15 - Leibovitz e F10 suplementados com humor vítreo (2%), soro fetal bovino (2%) e insulina (5µg/mL) sobre células da retina de <u>Notothenia neglecta</u> cultivadas <i>in vitro</i>	38
Figura 11.	Efeito dos meios de cultura 199, L15 – Leibovitz e F10 suplementados com humor vítreo (2%), soro fetal bovino (2%)e insulina (5µg/mL) sobre células da retina de <u>Trematomus newnesi</u> cultivadas <i>in vitro</i>	39
Figura 12.	Efeito dos meios de cultura 199, L15 - Leibovitz e F10 suplementados com humor vítreo (2%), soro fetal bovino (2%) e insulina (5µg/mL) sobre células da retina de <u>Nototheniops nudifrons</u> cultivadas <i>in vitro</i>	40
Figura 13.	Cultivo em monocamada de células da retina de <u>Nototheniops nudifrons</u>	41

Figura 14.	Cultivo em monocamada de células da retina de <u><i>Trematomus newnesi</i></u>	42
Figura 15.	Cultivo em monocamada de células da retina de <u><i>Notothenia neglecta</i></u>	43

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Sais orgânicos presentes nos meios de cultura utilizados para crescimento e manutenção das células da retina de peixes antárticos	21
Tabela 2. Aminoácidos presentes nos meios de cultura utilizados para crescimento e manutenção das células da retina de peixes antárticos	22
Tabela 3. Vitaminas e coenzimas presentes nos meios de cultura, utilizados para crescimento e manutenção das células da retina de peixes antárticos	23
Tabela 4. Componentes dos meios de cultura utilizados para crescimento e manutenção das células da retina de peixes antárticos	24
Tabela 5. Osmolaridade, pH e aspectos gerais dos meios de cultura utilizados para crescimento das células da retina de peixes antárticos	25
Tabela 6. Efeito da temperatura sobre o cultivo de células da retina de peixes antárticos.....	28
Tabela 7. Efeito dos meios de cultura e suplementos sobre a adesão das células da retina de peixes antárticos	29

Tabela 8.	Concentração protéica existente no humor vítreo das diferentes espécies de peixes antárticos	30
Tabela 9.	Efeito dos meios de cultura e suplementos sobre a viabilidade das células da retina do peixe <i><u>Notothenia neglecta</u></i> cultivadas <i>in vitro</i>	31
Tabela 10.	Efeito dos meios de cultura e suplementos sobre a viabilidade das células da retina do peixe <i><u>Trematomus newnesi</u></i> cultivadas <i>in vitro</i>	33
Tabela 11.	Efeito dos meios de cultura e suplementos sobre a viabilidade das células da retina do peixe <i><u>Nototheniops nudifrons</u></i> cultivadas <i>in vitro</i>	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	– Albumina Sérica Bovina
DMEM	– Dulbecco Meio Eagle Modificado
DMSO	– Dimetilsulfóxido
EACF	– Estação Antártica Comandante Ferraz
EDTA	– Ácido etilenodiaminotetracético
F10	– Meio Ham's F10
HV	– Humor vítreo
HBSS	– Solução salina balanceada de Hanks
L-15	– Meio de Leibovitz
MEM	– Meio essencial mínimo
PBS	– Solução tampão fosfato
SFB	– Soro fetal bovino

RESUMO

O cultivo *in vitro* de células de peixes diferem na intensidade de adesão de acordo com o tecido, órgão e o substrato utilizado. Em parte, essa característica difere também entre linhagens celulares nas condições de cultura, meio e temperatura, afetando ou dificultando as células a se dispersarem e aderirem às superfícies dos frascos. O objetivo principal do presente trabalho de pesquisa foi o de otimizar as condições de meios de cultura para o cultivo primário das células da retina de três espécies de peixes antárticos da Família *Nototheniidae*. Para tal propósito, um conjunto inicial de experimentos foi levado a efeito na Estação Antártica Comandante Ferraz. Amostras de retina obtidas de *Notothenia neglecta*, de *Nototheniops nudifrons* e de *Trematomus newnesi*, foram processadas, congeladas e mantidas em nitrogênio líquido e, então, transportadas para o Laboratório de Piscicultura, Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná. As células foram então submetidas à cultura primária em diferentes meios - DMEM, 199, F10 e L15, suplementados com soro fetal bovino, insulina ou humor vítreo de peixe. Quando cultivadas as temperaturas de 4° e 15°C, a viabilidade celular foi significativamente maior a 4°C. Verificou-se também, que o humor vítreo influencia de modo positivo, a viabilidade das células da retina em cultivo quando comparado aos demais fatores de crescimento. Dos meios utilizados, o 199, o F10 e o L15 foram os mais eficientes em relação à viabilidade e à adesão celular, enquanto que, o meio DMEM mostrou-se menos viável para o cultivo destas células. É fundamental ressaltar no presente trabalho, o importante achado em relação ao humor vítreo, pela primeira vez utilizado como suplemento nutricional para o crescimento e manutenção *in vitro* de células da retina.

ABSTRACT

The fish cells culture in vitro differs in the intensity of adhesion according to the tissue, organ and the substratum. This feature differs also among cells lines in culture conditions, medium and temperature, affecting or difficulting the cells to spread and to adhere to the surfaces of the bottles. The main aim of the present research was to optimize the conditions of culture medium for the primary culture of the retina cells of three species of Antarctic fishes of the *Nototheniidae* family. For such purpose, an initial set of experiments was accomplished in the Antarctic Station Commander Ferraz. Samples of retina were taken of *Notothenia neglecta*, *Nototheniops nudifrons* and *Trematomus newnesi*. They had been processed, frozen and kept in liquid nitrogen and then transported to the Psiculture Laboratory of the Federal University of Paraná. The cells were submitted to the primary culture in different medium - DMEM, 199, F10 and L15, supplemented with fetal bovine serum, insulin or fish humor vitreous of fish. When cultivated the temperatures of 4°C and 15°C, the cellular viability was significantly higher at the 4°C. It was also verified, that the humor vitreous influenced in a positive way, the viability of the retina cells in the culture when compared to the other growth factors. The 199, F10 and L15 of all the medium were the most efficient in relation to the viability and the cellular adhesion, while, the medium DMEM showed to be less viable for these cells culture. It is fundamental to make note worthy in this research the important finding in relation to the humor vitreous, for the first time used as nutritional supplement for the growth and maintenance in vitro of retina cells.

I - INTRODUÇÃO

Peixes da família Nototheniidae são de grande variedade no ambiente marinho antártico, distribuídos nas águas geladas do hemisfério Sul, incluindo América do Sul e Nova Zelândia (Figuras 1 e 2). Além da baixa temperatura, existem vários níveis de luminosidade que se diferenciam entre as áreas de gelo e durante o inverno polar, sendo então, a visão um dos fatores mais afetados pelas propriedades ópticas da água, evidenciando uma modalidade sensorial dominante nos peixes teleósteos (MACDONALD & MONTGOMERY, 1990).

Vertebrados marinhos, tais como os peixes teleósteos, são amplamente protegidos de ambientes com radiação ultravioleta por diferentes escalas, mas sabe-se que tecidos oculares, entretanto, podem ser vulneráveis aos danos ocasionados pela luz ultravioleta, sendo afetados através da absorção do foco de luz pela córnea e pelo cristalino e transmitido diretamente para a retina. (DUNLAP *et al.*, 1989). Alguns estudos demonstraram que a retina de peixes da família Nototheniidae é estruturalmente apropriada à baixa intensidade de luz e responde à alta luminosidade através de movimentos retinomotores (PHAN, 1986, 1990). Os fatores estruturais dos olhos estão mostrados na Figura 3.

O desenvolvimento da retina é semelhante a de outros tecidos, ocorrendo via uma sequência ordenada de divisão celular e diferenciação. Em peixes teleósteos, ao contrário de outros, a retina continua seu crescimento durante toda a vida do animal, renovando o tecido pela adição de células novas; este processo em animais adultos resume-se em um espaço de eventos embrionários responsáveis pela formação da retina (HAGEDORN *et al.*, 1998; JULIAN *et al.*, 1998).

A retina é um excelente modelo biológico para se estudar a diferenciação do sistema nervoso, principalmente por sua estrutura laminar bem definida (ZHAO & BARNSTABLE, 1996). As células visuais e uma camada de elementos

neuronaes constituem a retina através de um processo de informação visual transmitido para o cérebro. Todos os peixes Nototeniíodes possuem uma dupla camada bem desenvolvida de retina, contendo células ganglionares, células pigmentares, células horizontais (astrócitos) e os três principais tipos de fotoreceptores: cones simples, cones duplos e bastonetes.

Vários experimentos têm utilizado retina em estudos biomédicos, bioquímicos, biofísicos, neurofisiológicos e de propriedades farmacológicas, principalmente acerca de tipos de células individuais. Na retina de peixes, as células horizontais são as mais estudadas, sendo entretanto, difíceis a sua manutenção em cultivo por longo período de tempo (DOWLING *et al.*, 1983, 1985; LAM & AYOUB, 1983; HIGHTOWER & RENFRO, 1988).

O sistema de cultivo celular tem sido realizado em várias espécies de peixes em estudos de propriedades neuronaes, pelo motivo de se ter uma maior capacidade em controlar o ambiente neuronal e suas atividades, até porque as células são dissociadas do tecido intacto e suas características morfológicas passam a ser avaliadas nos diferentes tipos de células presentes (AKAGAWA & BARNSTABLE, 1986; ZHAO & BARNSTABLE, 1996). Suas maiores vantagens são suas características diferenciadas e sua capacidade de se reorganizar em monocamada. Este isolamento permite o controle por certos hormônios, substratos e condições físicas, que alteram de forma variável as funções celulares.

OZOWSKI (1914), citado por WOLF & DUNBAR (1957) observou movimentos celulares em fragmentos de girinos e trutas mantidos por um período de 24 horas em solução de Ringer fosfato e em linfa de anfíbios. LEWIS em 1916 descreveu um meio fisiológico baseado em água do mar como fonte nutricional. CHLOPIN (1928) cultivou tecidos de carpa (*Cyprinus carpio*) em plasma de coelho diluído com extrato homogêneo de baço de peixe (WOLF & DUNBAR, 1957).

A partir de 1948, tecidos de barrigudinhos do gênero Fundulus e de Goldfish - Carassius auratus foram cultivados em extrato embrionário, composto de soro de peixe, soro de galinha ou cordão umbilical humano como suplementos, adicionados com penicilina. O uso destes antibióticos, permitiu grande avanço em cultura de tecidos animais principalmente na manutenção desta técnica, mesmo envolvendo uma seleção intensa de drogas e de suas concentrações para serem empregadas corretamente, pois os antibióticos diferem nos efeitos produzidos sobre as células com respostas variáveis, particularmente a agentes antimicrobianos (WOLF & DUNBAR, 1957).

GRÜTZNER em 1958 utilizou, pela primeira vez, a tripsinização em tecidos de peixes obtendo células isoladas e cultivando-as em monocamada. As subculturas passaram então, a ser efetivadas através de procedimentos mecânicos por dispersão e pelo uso da tripsina com ou sem EDTA.

Comparando com cultivos celulares de aves e mamíferos, as culturas de células de peixes crescem em temperaturas inferiores e raramente exigem trocas de meio entre as subculturas. Detalhes técnicos sobre este assunto são encontrados em publicações de WOLF & QUIMBY (1969,1976) e SIGEL & BEASLEY (1973).

Em 1980, WOLF & MANN reuniram informações sobre 61 linhagens de células de peixes representando 17 famílias e 36 espécies de teleósteos, a maioria de peixes de água doce e somente 22% de água marinha.

CHENG *et al.*, em 1993 publicaram estudos sobre o desenvolvimento de culturas celulares derivadas de rim e fígado de truta (Salvelinus namaycush) utilizando suplementação hormonal e redução de soro fetal bovino para 2% em meio 199. As células que se proliferaram sobre o substrato com fibronectina tiveram uma eficiência de 87-93% de adesão, e através destes resultados e com a adição de albumina sérica bovina, de fatores de crescimento (fator de

crescimento epidermal -EGF), de insulina, transferina, selênio e toxina colérica como suplementos, obtiveram 32 subculturas primárias durante um período de 6 meses, cultivadas à uma temperatura de 18° a 20°C.

Várias são as dificuldades para se manter um cultivo de tipos específicos de células *in vitro*, principalmente por expressarem estágios diferentes de desenvolvimento e diferenciação. Uma variedade de fatores de crescimento podem influenciar na expressão de propriedades diferenciadas de certos tipos celulares da retina, isto porque, muitos destes estão envolvidos na maturação e na manutenção da sobrevivência destas células, acelerando o aparecimento das células ganglionares em cultivo.

Existem evidências que fatores difusíveis, incluindo o fator de crescimento fibroblástico - FGFs (HICKS & COURTOIS, 1992), fator neurotrófico ciliar (Ciliary Neurotrophic Factor – CNTF) proteína intracelular que age como fator neurotrófico, após traumatismos do sistema nervoso, mas não durante o desenvolvimento normal (REHEN *et al.*, 1993; FUHRMANN *et al.*, 1995) e o ácido retinóico (KELLY *et al.*, 1994), podem influenciar na diferenciação de células da retina dispersas em cultivo. Estes estudos mostraram aumento no número ou na proporção de tipos celulares em particular, sem uma constante total de números celulares, pois quando interpretados sugerem que os fatores de crescimento estão influenciando concomitantemente na diferenciação das células (ZHAO & BARNSTABLE, 1996).

Os fatores de crescimento celular são essenciais na divisão, proliferação, expansão, adesão e diferenciação celular. Relatos confirmam que o fator de crescimento epidermal (EGF) pode ser encontrado no fluido lacrimal humano e além deste, o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) e o TGF- β (Transforming Growth Factor) encontrados no humor aquoso e o TGF- β em humor vítreo humano. O humor aquoso e o humor vítreo não somente mantém a

integridade do globo ocular, como possuem uma importância fundamental na nutrição dos tecidos oculares (MAJIMA, 1997).

Fatores de crescimento típicos de outros tecidos têm também ação sobre células nervosas. O fator de crescimento fibroblástico (FGF), o fator inibidor de leucemia (LIF), também conhecido como fator de diferenciação colinérgica, e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) possuem efeitos protetores sobre neurônios em preparações experimentais. Pesquisas têm demonstrado que as células da retina mantidas em cultura secretam moléculas, indicadas bioquimicamente como proteínas que possuem ação neurotrófica sobre as células ganglionares (LINDEN, 1993).

A insulina é um hormônio polipeptídico produzido e secretado pelas células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas e induz ampla ação biológica, envolvendo a síntese de proteínas, lipídios e a transcrição gênica. Estimula a proliferação de neuroblastos simpáticos, implicando na possibilidade de regulação do ciclo celular dos precursores neuronais (MACK & FERNALD, 1991, 1993; SRIVASTAVA, 1998) atuando sinergisticamente com vários fatores de crescimento (STRAUSS, 1984).

A utilização do soro fetal bovino como suplemento nos meios de cultura vêm sendo muito criticada em alguns tipos de cultivos de células. As vantagens e desvantagens do soro como suplementação é muito discutida. Durante décadas o soro animal tem sido utilizado como suporte na proliferação *in vitro* de células de linhagens e de cultivos primários. Atualmente, em alguns casos a alternativa de eliminação do soro é muito indicada, ou o enriquecimento de nutrientes sintéticos ao meio que possa permitir a redução do soro. Várias combinações de insulina, piruvato de sódio, etanolamina e outros componentes permitem a redução significativa de soro fetal bovino em alguns cultivos, sem alterações no meio nutriente.

Estudos bioquímicos vem sendo realizados para correlacionar, o uso do soro na padronização de bioensaios, com o objetivo de defini-lo como um dos componentes essenciais nas atividades de alguns tipos celulares *in vitro*. Entre outros parâmetros, também bioquímicos, pode-se monitorar o envolvimento de enzimas, hormônios, fatores de adesão e de crescimento.

SPRADA MAIA *et al.* (1995) estudaram os efeitos dos clorofenoxiacetatos sobre o comportamento bioquímico e fisiológico de organismos aquáticos em modelos experimentais em cultivo de peixes de água doce (*Ciprynus carpio*, *Prochilodus scrofa*) e peixes marinhos (*Cathuropsis sphynx*, *Genidens genidens*) para a verificação dos efeitos destes agressores químicos sobre o metabolismo celular. O cultivo de células de fígado de peixes da família Cichlidae (*Oreochromis niloticus*) foi avaliado bioquimicamente através da atividade respiratória no respirômetro de Warburg, assim como outros exemplares de tecidos de peixes antárticos colhidos durante a XV Expedição Antártica Brasileira (SPRADA MAIA *et al.*, 1996, 1998).

LOPEZ-COLOMÉ *et al.*, em 1996, descreveram que a presença de soro em estágios definidos do desenvolvimento das células da retina de galinha pode elevar o glutamato extracelular e ocasionar a morte excitotóxica das células neuronais. Este fato nos leva a hipóteses de estar ocorrendo apoptose pela presença de diferentes concentrações de soro ou de determinados componentes nos meios de cultura, pois apoptose é um mecanismo celular programado que requer energia e síntese protéica para sua execução, relacionado com a homeostase na regulação fisiológica e exercendo um papel oposto ao da mitose. Fisiologicamente, este suicídio celular ocorre na renovação de células epiteliais, na senilidade, na maturação, na diferenciação celular e na hipotrofia induzida pela remoção de fatores de crescimento ou hormônios, entre outros (SCHWARTZ *et al.*, 1995; DELFINO *et al.*, 1997).

Usando explantes de retina de rato mantidos *in vitro*, LINDEN & CHIARINI (1999) induziram seletivamente a apoptose em uma população celular com distintos estágios do desenvolvimento fora do tecido. Os explantes mantêm uma organização histológica e sofrem um progressivo desenvolvimento com um período de tempo similar ao da retina *in situ*. Estas preparações servem, entretanto, como método de estudos *in vitro* para ambas diferenciação e degeneração fora do tecido da retina, e como modelo generalizado para o desenvolvimento de eventos, incluindo apoptose.

A glicose, como é um dos componentes mais destacados nas formulações dos meios de cultura, é rapidamente transportada e metabolizada na presença de oxigênio como fonte de energia para a proliferação celular e biológica. Assim como a glicose, outras substâncias foram analisadas no contexto de nutrientes de um meio de cultura. LEIBOVITZ (1963) formulou um meio, originalmente para uso em sistemas livres de gás carbônico, requerendo bicarbonato de sódio como suplemento. Este meio é tamponado e constituído de sais minerais, aminoácidos livres e galactose como substituto da glicose para ajudar na manutenção do controle fisiológico do pH (JAYME, 1991).

Em 1955, MORGAN e seus colaboradores produziram uma fonte nutricional totalmente definida para cultura de células. Seus experimentos conduziram a uma variação de vitaminas e aminoácidos, dentre outros fatores, relevantes para o crescimento de explantes de tecidos que, quando suplementado ao meio 199, possui grande aplicabilidade principalmente em cultivo de células primárias.

Os requerimentos nutricionais são extremamente necessários, tanto qualitativa quanto quantitativamente em relação aos elementos específicos como íons, vitaminas, aminoácidos, etc. Considerando o fato de que algumas células de peixes e tecidos em cultivo são mantidas atualmente em meios sintéticos com suplementos naturais e que estes tem se demonstrado superiores aos antigos

meios, aparentemente são poucas as justificativas na discussão e enumeração de preparações mais primitivas.

O interesse no estudo de requerimentos nutricionais para cultivos celulares, partiu de revisões parciais por GRÜTZNER (1956), WOLF & DUNBAR (1957) e FRYER *et al.* (1965), que passaram a empregar meios semi-sintéticos, como meio 199, em cultura de tecidos de peixes. Depois surgiram o meio mínimo essencial Eagle (MEM) e o meio basal Eagle (BME), porém, para células de peixes são também utilizados os meios CMRL 1066, Leibovitz L-15, McCoy's, NCTC 109 e Puck's.

O meio F10 foi formulado para uso com e sem suplementação de soro, dependendo do tipo celular cultivado, principalmente em explantes primários, células sanguíneas, células humanas diplóides, etc.

O meio Eagle MEM é um dos meios mais sugeridos para a rotina de cultura de células e tecidos de peixes, mesmo admitindo-se que o meio 199 tem sido citado frequentemente em diversas publicações.

EAGLE (1976) desenvolveu um dos meios mais utilizados em cultura de células, principalmente para o crescimento em monocamada. O meio definido como DMEM, foi desenvolvido a partir da fórmula original do meio Eagle que contém quatro vezes mais aminoácidos e vitaminas, assim como alguns componentes adicionais para otimizar o cultivo de alguns tipos celulares.

A otimização de nutrientes atualmente explora análises quantitativas de meios condicionados para permitir um procedimento racional na formulação, vindo a facilitar a aplicação de nutrientes específicos em pesquisas com aplicações biotecnológicas e farmacêuticas.

Os sistemas de cultura de células da retina podem ser usados também como modelos para estudos de patologia da excitotoxicidade e hipóxia, ajudando a identificar, potencialmente, o uso de agentes terapêuticos clínicos (SHIGEHICO *et al.*, 1996), em estudos de carcinogênese pois, os teleósteos são susceptíveis a carcinógenos químicos e no desenvolvimento e uso de cultura de células para aplicação comercial de invertebrados aquáticos, no que se refere ao controle toxicológico ambiental.

O objetivo do presente trabalho, com fundamento em experimentos preliminares levados a efeito com retina de peixes antárticos (WÖEHL *et al.*, 1997; SPRADA MAIA *et al.*, 1998) foi o de avaliar o comportamento das células da retina de peixes antárticos *in vitro*, através do cultivo primário, na presença de diferentes meios de crescimento, acrescidos de suprimentos basais como o humor vítreo extraído do próprio animal, a insulina e o soro fetal bovino, além da avaliação nas subculturas, na adesão celular, no congelamento e descongelamento e na temperatura de cultivo destas células.

Por outro lado é importante ressaltar nas considerações do presente trabalho, o fato de que o humor vítreo dos peixes em estudo foi utilizado como suplemento nutricional, para o cultivo de células da retina *in vitro*, constituindo-se este fato, no primeiro relato experimental desta natureza, no que se refere a esse tipo de experimento biológico.

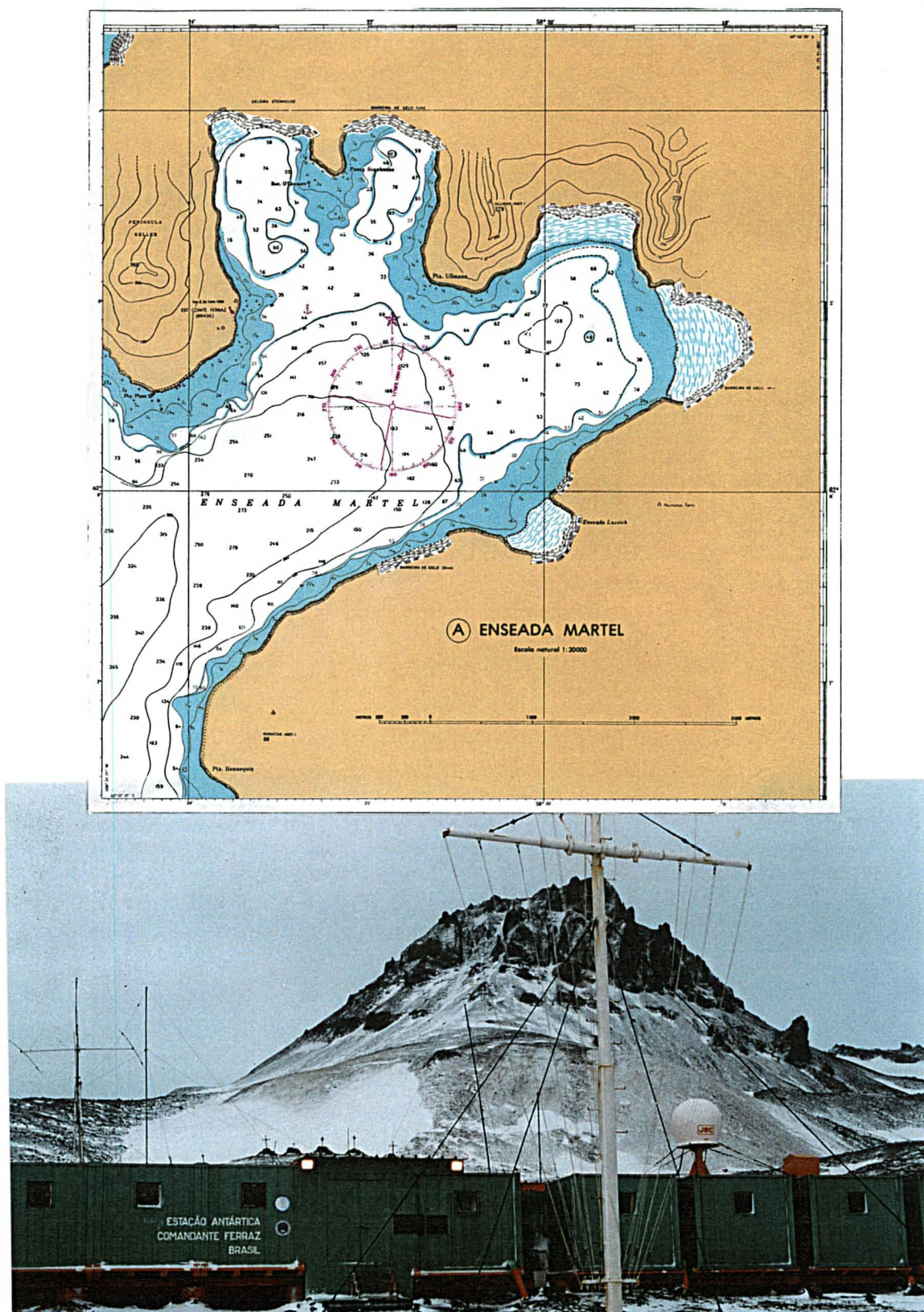


Figura 1 – Mapa da Baía do Almirantado, Arquipélagos das Shetland do Sul, Ilha Rei George, Antártica e Estação Antártica Comandante Ferraz.

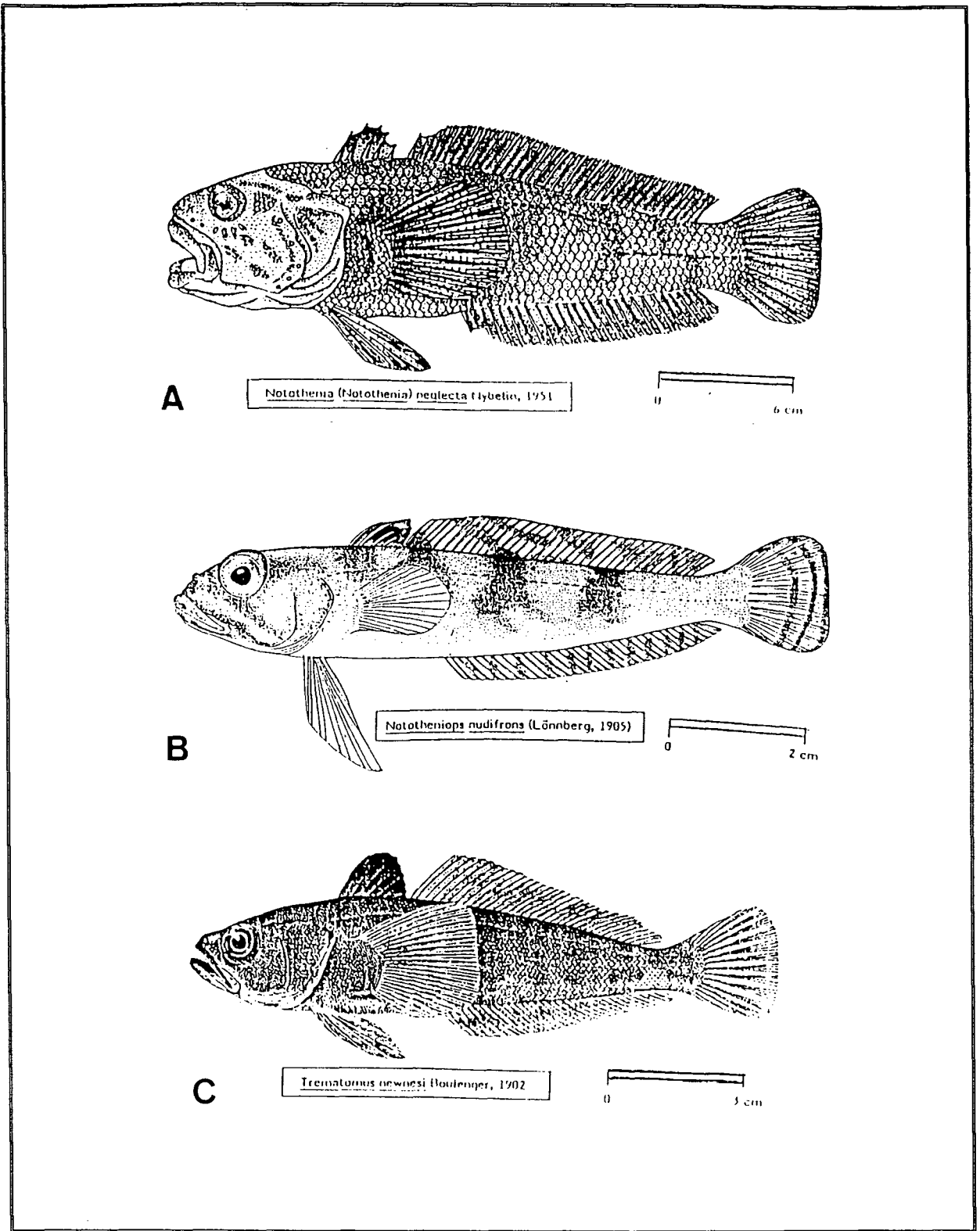


Figura 2 – Peixes antárticos estudados no presente trabalho. A - *Notothenia (Notothenia) neglecta*, Nybelin, 1951. B - *Nototheniops nudifrons* Lönnberg, 1905. C - *Trematomus newnesi* Boulenger, 1902 (FISCHER & HUREAU, 1985).

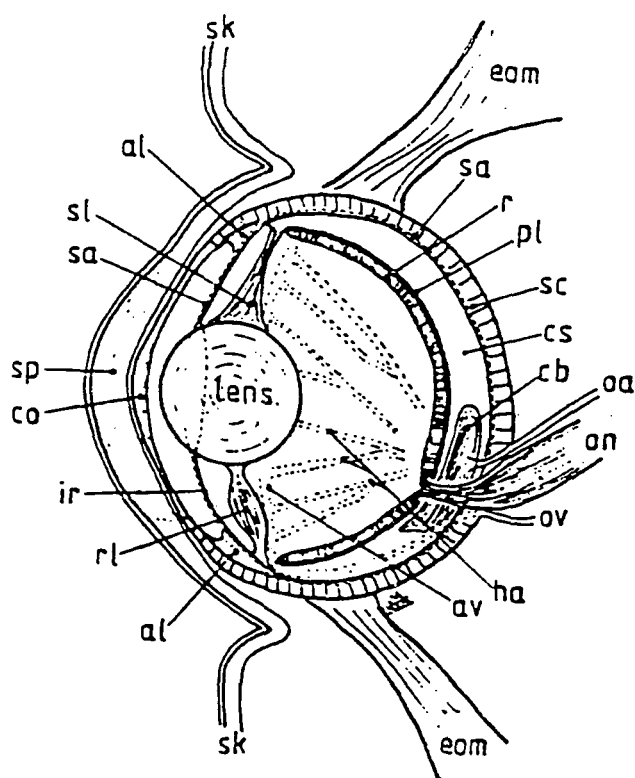


Figura 3 - Secção diagramática do olho de peixe da família Nototheniidae. *al*: ligamento anular; *av*: veia anular; *cb*: corpo coróide; *co*: córnea; *cs*: espaço coróide; *eom*: músculo extraocular; *ha*: artéria hialóide; *ir*: íris; *ao*: artéria oftálmica; *on*: nervo óptico; *ov*: veia oftálmica; *pl*: camada pigmentar da retina; *r*: retina; *rl*: lente refletora; *sa*: estrato argenteo; *sc*: esclera; *sk*: pele; *sl*: ligamento; *sp*: espetáculo; (MACDONALD & MONTGOMERY, 1990).



Figura 4 – Laboratórios de realização experimental do presente projeto.
A: Laboratório de Biologia da Estação Antártica Comandante Ferraz;
B: Laboratório de Cultivo Celular do Instituto de Tecnologia do Paraná.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Espécies de peixes antárticos foram capturados na Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Arquipélago das Shetlands do Sul, Península Antártica. A pesca foi realizada na região frente à Estação Antártica Comandante Ferraz, durante a XVI Expedição Antártica Brasileira (verão 97/98). A profundidade de captura foi de aproximadamente 40 metros, utilizando-se rede tipo Feiticeira. Os peixes foram transportados para o laboratório da estação (EACF) e mantidos em aquários com circulação de água, aeração constante e temperatura controlada (0°C).

Foram obtidos peixes das seguintes espécies: *Notothenia neglecta*, *Nototheniops nudifrons* e *Trematomus newnesi* (Família Nototheniidae).

2.2. MEIOS DE CULTURA E SUPLEMENTOS

DMEM (Sigma D2902), MEM (Sigma M0643), L-15 Leibovitz (Sigma L4386), Ham's F-10 (Cultilab), Meio 199 (Sigma M7667), Tripsina-EDTA, Penicilina, Estreptomicina, Soro Fetal Bovino, Insulina Humana (Biobrás);

CORANTE - Trypan Blue;

REAGENTES E SOLUÇÕES - HBSS (Solução Tampão Fosfato), Extran Neutro (MA02, Merck), Dimetilsulfóxido (DMSO), Glicerina.

2.3. EQUIPAMENTOS E MATERIAL DE LABORATÓRIO

Na realização do presente experimento, foram utilizados os seguintes equipamentos e material de laboratório:

- 2.3.1. Agitador magnético marca Phoenix,
- 2.3.2. Autoclave vertical marca Fabbe,
- 2.3.3. Balança analítica, marca Micronal,
- 2.3.4. Balança para tubos, marca Record,
- 2.3.5. Banho Maria marca Prodicil,
- 2.3.6. Barras magnéticas de diversos tamanhos,
- 2.3.7. Bomba de vácuo Millipore,
- 2.3.8. Botijão criobiológico, modelos SM 33 Cryometal,
- 2.3.9. Câmara asséptica marca Permution,
- 2.3.10. Câmara para contagem celular Improved, Neubauer,
- 2.3.11. Centrífuga clínica de mesa marca VWR,
- 2.3.12. Criotubos Nunc,
- 2.3.13. Destilador de vidro Suprilab,
- 2.3.14. Estufa bacteriológica, Fanem,
- 2.3.15. Estufa para secagem e esterilização marca Fanem,
- 2.3.16. Filtro autoclavável capacidade 250 mL, marca Sartorius,
- 2.3.17. Fluxo laminar vertical da marca Veeco, Campinas - Brasil,
- 2.3.18. Freezer (-20°C),
- 2.3.19. Garrafas para cultivo celular, capacidade 25 e 75 cm², Corning,
- 2.3.20. Impressora BJC – 240L, marca Canon,
- 2.3.21. Materiais cirúrgicos em geral,
- 2.3.22. Materiais de pesca em geral,
- 2.3.23. Microcomputador Samsung,
- 2.3.24. Micropipetas 10, 100, 200 e 1000 μL , Eppendorf e Gilson,
- 2.3.25. Microplacas 24 e 96 poços, Corning,
- 2.3.26. Microscópio óptico invertido trinocular, marca Olympus,

- 2.3.27. Pipetador automático marca Gilson,
- 2.3.28. Ponteiras de polipropileno para micropipetas,
- 2.3.29. Potenciômetro marca Analyser,
- 2.3.30. Refrigerador,
- 2.3.31. Seringas de 5 e 10 mL, marca BD,
- 2.3.32. Tubos de transporte capacidade 20 mL, Nunc,
- 2.3.33. Vidrarias em geral.

2.4. MÉTODOS

2.4.1. OBTENÇÃO DA RETINA E CULTIVO EM MONOCAMADA

Para a obtenção das células de retina de peixe as seguintes etapas foram desenvolvidas na Estação Antártica Comandante Ferraz:

1. Os peixes foram mantidos e aclimatados em sala de triagem da Estação.
2. Após anestesiados com xilocaína diluída em acetona 2%, foram descontaminados superficialmente em solução de hipoclorito de sódio 2,5% ou álcool 70% por 2 a 5 minutos. Retirado o excesso do descontaminante, os peixes foram levados à câmara asséptica previamente esterilizada por luz ultravioleta e sacrificados por secção medular. A remoção dos órgãos e tecidos foi realizada com o auxílio de material cirúrgico devidamente esterilizado.
3. Após a enucleação do globo ocular, com o auxílio de uma seringa, foi coletado o humor vítreo (HV), e congelado à -20°C em tubos criobiológicos para uso posterior em meio de cultura.
4. Em placa de Petri contendo PBS e antibióticos (Penicilina 100 UI/mL e Estreptomicina 100 $\mu\text{g/mL}$), com o auxílio de pinças e tesouras especiais, a calota superior do olho foi retirada, e a retina localizada e colocada cuidadosamente em becker contendo solução de Hanks, antibióticos (Penicilina 100 UI/mL e Estreptomicina 100 $\mu\text{g/mL}$) e Fungizon (100 μl).

5. Amostras de fragmentos da retina foram colocadas em becker mantido constantemente em gelo, contendo tripsina 0,25%, por 15 minutos, em agitação magnética. A outra amostra em meio sem soro e dispersada mecanicamente através de pipetagens sucessivas,
6. O material assim processado foi filtrado em gase estéril e a suspensão obtida por tripsinização, inativada pela adição do soro fetal bovino (SFB),
7. Após centrifugação a 1000 rpm por 10 minutos os "pellets" celulares foram ressuspensos em meios de cultura contendo suplementos em diferentes concentrações.
8. Da suspensão celular, foi retirada uma alíquota para contagem celular em câmara de Neubauer ajustando-se a concentração a um número aproximado de 3×10^6 células/mL de meio sem soro. Restante da suspensão celular foi utilizada para congelamento em nitrogênio líquido e parte para o cultivo em monocamada para ensaios locais.
9. As células foram semeadas em microplacas de 96 poços, em garrafas de cultivo Corning 75 cm² e em tubos de Leighton, mantidas em diferentes temperaturas (4°C, 15°C e 22°C).
10. Após cultivo de 24 e 48 h, as células foram observadas em microscópio óptico invertido, quanto à sua adesão e ao crescimento celular (teste de viabilidade celular).

2.4.2. CONGELAMENTO CELULAR

O congelamento das células primárias de peixes, foi levado a efeito pela seguinte técnica: em 0,5 mL da suspensão celular adiciona-se 8,5 ml de meio de congelamento contendo DMSO ou glicerina (10%) e soro fetal bovino (90%), e a seguir distribuí-se em alíquotas de 1 mL por ampola de congelamento (2 ml). Esta etapa de congelamento foi realizada lentamente, as ampolas foram

acondicionadas em caixas de isopor no congelador -20°C por 24 horas, depois em câmara fria a -60°C e finalmente em nitrogênio líquido.

2.4.3. DESCONGELAMENTO CELULAR

As ampolas foram retiradas do nitrogênio líquido e imediatamente descongeladas em banho-maria com temperatura aproximada de 4°C. Após o total descongelamento e a descontaminação externa com álcool 70%, as ampolas foram transferidas para a câmara de fluxo laminar. A suspensão celular foi retirada assepticamente com auxílio de pipeta e transferida para um tubo de centrífuga contendo meio de cultura sem suplementos. As amostras foram centrifugadas a 600 rpm por 5 minutos e o "pellet" foi ressuspenso em meio com os diferentes suplementos. A seguir, as células foram semeadas em garrafas de cultivo, permanecendo em repouso por 1 hora para adesão das células viáveis. As células, assim tratadas, foram mantidas à temperatura de 4°C por 24, 48 e 72 horas para a determinação da viabilidade celular.

2.4.4. SUBCULTURAS

O método de subculturas foi utilizado para obtenção de passagens seriadas das culturas, preservando as células por mais tempo. Com a obtenção de uma monocamada celular confluyente em garrafa de cultivo, foi realizado o descarte do fluido sobrenadante e a seguir adicionados 2 ml da solução de Tripsina - EDTA incubando-se por 30-60 segundos à temperatura ambiente. Após o descolamento das células, um total de 5 a 10 ml de meio de crescimento foi adicionado ao sistema, suspendendo-se com cuidado as células.

A suspensão celular foi diluída na proporção de 1:3 e uma alíquota foi retirada para a contagem celular com "Trypan Blue". As células foram cultivadas em microplacas de 96 poços, adicionando-se os meios contendo os suplementos a

serem avaliados (soro fetal bovino 2%, humor vítreo 2% e insulina 5µg/mL). Após incubação de 24, 48 e 72 horas à 4°C foi avaliada a curva de crescimento através da determinação de células viáveis com “Trypan Blue”.

Algumas das garrafas contendo células em monocamada confluyente após 24 horas foram congeladas para estoque em nitrogênio líquido, seguindo a metodologia de congelamento já mencionada (2.4.2.).

2.4.5. DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR COM “TRYPAN BLUE” APÓS DESCONGELAMENTO PARA VERIFICAÇÃO DO POTENCIAL DE CRESCIMENTO DAS CÉLULAS *IN VITRO*.

O “Trypan Blue” é um dos corantes mais recomendados para o uso em contagem de células viáveis. Este método é baseado no princípio de que as células vivas (viáveis) não são coradas, enquanto que, as células mortas são coradas. É a seguinte a técnica utilizada:

1. Com a adição de 0,3 ml de solução salina e 0,2 ml da suspensão celular (fator de diluição= 5), homogeneizou-se e por alguns minutos* deixou-se sedimentar.
2. As células foram suspensas e transferidas com o auxílio de uma pipeta Pasteur para ambos os lados da Câmara de Neubauer, evitando-se o transbordamento.
3. Após a observação das células ao microscópio, iniciou-se a leitura, repetindo o mesmo procedimento no segundo lado da câmara.

Para a determinação do número de células por mL da suspensão original foi utilizada a seguinte fórmula: $A/B \times C \times D = Z$ onde:

A= Número de células contadas

B= Número de quadrantes da câmara contados

C= Fator de correção (Neubauer = 10.000)

* Se as células forem expostas ao “Trypan Blue” por tempo prolongado, tanto as células viáveis, como as não viáveis podem ser totalmente coradas.

D= Fator de diluição (5)

Z= Número de células/mL da suspensão original

Células Totais = células/mL x volume original da suspensão celular.

A metodologia de contagem da viabilidade celular é a seguinte:

- ♦ Contar separadamente o número de células vivas (não coradas) e células mortas (coradas) até atingir um número superior a 250 células. Caso o total de células seja inferior a 250, retirar mais amostras da mistura de suspensão celular com o corante.
- ♦ Efetuar os cálculos a fim de obter a porcentagem de células vivas através da seguinte fórmula:

$$\boxed{\text{Total de células vivas} / \text{Total de células (coradas e não coradas)} \times 100}$$

2.4.6. CONCENTRAÇÃO PROTÉICA DO HUMOR VÍTREO

Para determinação do conteúdo de proteína total do humor vítreo obtido de peixes antárticos foi utilizado o método de BRADFORD (1976), usando-se albumina sérica bovina como padrão.

2.4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos experimentos foram expressos como médias \pm erro padrão da média. Os dados foram submetidos ao Teste “t” de Student para um nível de significância de $p < 0,05$.

TABELA 1 – Sais orgânicos presentes nos meios de cultura utilizados para crescimento e manutenção das células da retina de peixes antárticos.

Sais Orgânicos	DMEM g/L	L – 15 g/L	199 g/L	F – 10 g/L
Cloreto de Cálcio 2H ₂ O	0.265	0.1885	0.265	0.0441
Cloreto de Magnésio. 6H ₂ O	-	0.2	-	-
Cloreto de Potássio	0.4	0.4	0.4	0.285
Cloreto de Sódio	6.4	8.0	6.8	7.4
Fosfato de Sódio Dibásico	-	0.19	-	0.1537
Fosfato de Sódio Monobásico	0.109	0.06	0.122	0.083
Bicarbonato de Sódio	3.7	-	-	1.2
Nitrato Férrico.9H ₂ O	0.0001	-	0.00072	-
Sulfato Cúprico.5H ₂ O	-	-	-	0.0000025
Sulfato Ferroso.7 H ₂ O	-	-	-	0.000834
Sulfato de Magnésio	0.09767	0.09767	0.09767	0.07464
Sulfato de Zinco.7 H ₂ O	-	-	-	-

TABELA 2 – Aminoácidos presentes nos meios de cultura utilizados para crescimento e manutenção das células da retina de peixes antárticos

Aminoácidos	DMEM g/L	L – 15 g/L	199 g/L	F – 10 g/L
Alanina	-	DL = 0.45	L = 0.05	L = 0.009
Ácido Glutâmico	-	-	L = 0.1336	L = 0.0147
Ácido Aspártico	-	-	L = 0.06	L = 0.0133
L-Arginina	0.084	0.5	0.07 (HCl)	0.211 (HCl)
L-Asparagina	-	0.25	-	0.01501
L-Cisteína	-	0.12	0.00011	0.025
L-Cistina. 2HCl	0.0626	-	0.026	-
L-Glutamina	0.584	0.3	0.1	0.146
L-Histidina	0.042	0.25	0.02188(HCl.H ₂ O)	0.023
L-Lisina	0.146	0.075	0.07 (HCl)	0.0293
L-Prolina	-	-	0.04	0.0115
L-Tirosina	0.10379	0.3	0.05766(2Na.2H ₂ O)	0.00181
Isoleucina	L = 0.105	L = 0.25	L = 0.04	L = 0.026
Leucina	L = 0.105	L = 0.125	L = 0.12	L = 0.0131
Glicina	0.030	0.2	0.05	0.00758
Metionina	L = 0.030	DL = 0.15	L = 0.03	L = 0.00448
Fenilalanina	L = 0.066	DL = 0.25	L = 0.05	L = 0.005
Hidroxi L-Prolina	-	-	0.01	-
Serina	L = 0.042	L = 0.2	L = 0.05	L = 0.0105
Treonina	L = 0.095	DL = 0.6	L = 0.06	L = 0.00357
Triptofano	L = 0.016	L = 0.02	L = 0.02	L = 0.0006
Valina	L = 0.094	DL = 0.2	L = 0.05	L = 0.0035

TABELA 3 - Vitaminas e coenzimas presentes nos meios de cultura utilizados para crescimento e manutenção das células da retina de peixes antárticos

Vitaminas	DMEM g/L	L - 15 g/L	199 g/L	F - 10 g/L
Acetato Retinol	-	-	0.00014	-
Ácido Fólico	0.004	0.001	0.00001	0.00132
Ácido Pantotênico	D = 0.004	DL = 0.001	D = 0.00001	D = 0.000715
Ácido p-Amino benzóico	-	-	0.00005	-
Ácido Nicotínico	-	-	0.000025	-
Ácido Ascórbico Na	-	-	0.0000566	-
D-Biotina	-	-	0.00001	0.000024
Cloreto de Colina	0.004	0.0001	0.0005	0.000698
Calciferol	-	-	0.0001	-
Flavina Mononucleotídeo Na	-	-	-	-
Mio-Inositol	0.0072	0.002	0.00005	0.000541
Menadione	-	-	0.0000166	-
Niacinamida	0.004	0.001	0.000025	0.004
Piridoxina-HCl	-	0.001	0.000025	-
Piridoxal. HCl	0.004	-	0.000025	0.004
Riboflavina	0.0004	-	0.0001	0.0004
Tiamina. monofosfato HCl	0.004	0.001	0.00001	0.004
DL - Tocoferol Fosfato Na	-	-	0.00001	-
Vitamina B-12	-	0.00136	-	-

TABELA 4 – Componentes dos meios de cultura utilizados para crescimento e manutenção das células da retina de peixes antárticos.

Componentes	DMEM g/L	L – 15 g/L	199 g/L	F – 10 g/L
Glicose	4.500	-	1.000	1.100
D-Galactose	-	0.900	-	-
Vermelho de Fenol Na	0.0159	0.011	0.0213	0.0012
Ácido Lipóico	-	-	-	0.00020
Ácido Pirúvico.Na	0.11	0.55	-	0.110
Ácido Tioctico	-	-	-	-
Adenosina Trifosfato 2Na	-	-	0.001	-
Adenosina Monofosfato Na	-	-	0.0002385	-
Adenina Sulfato	-	-	0.01	-
Colesterol	-	-	0.0002	-
Desoxiribose	-	-	0.0005	-
Glutatione (reduzido)	-	-	0.00005	-
Guanina.HCl	-	-	0.0003	-
Hipoxantina	-	-	0.0003	0.00408
Tween 80	-	-	0.02	-
Ribose	-	-	0.0005	-
Uracil	-	-	0.0003	-
Timidina	-	-	-	0.00073
Timina	-	-	0.0003	-
Xantina Na	-	-	0.000344	-

TABELA 5 – Osmolaridade, pH e aspectos gerais dos meios de cultura utilizados no crescimento e na manutenção das células da retina de peixes antárticos.

Especificações	DMEM g/L	L – 15 g/L	199 g/L	F – 10 g/L
pH sem Bicarbonato de Sódio	6.2 ± 0.3	6.5 ± 0.3	7.3 ± 0.3	6.8 ± 0.3
Osmolaridade - MOsm/Kg H ₂ O - Sem Bicarbonato de Sódio	$240 \pm 5 \%$	$260 \pm 5 \%$	$287 \pm 5 \%$	$252 \pm 5 \%$
Osmolaridade - MOsm/Kg H ₂ O - Com Bicarbonato de Sódio	$310 \pm 5 \%$	$285 \pm 5 \%$	$300 \pm 5 \%$	$282 \pm 5 \%$
Aspecto	Róseo e homogêneo	Róseo e homogêneo	Róseo e homogêneo	Amarelo-róseo, homogêneo

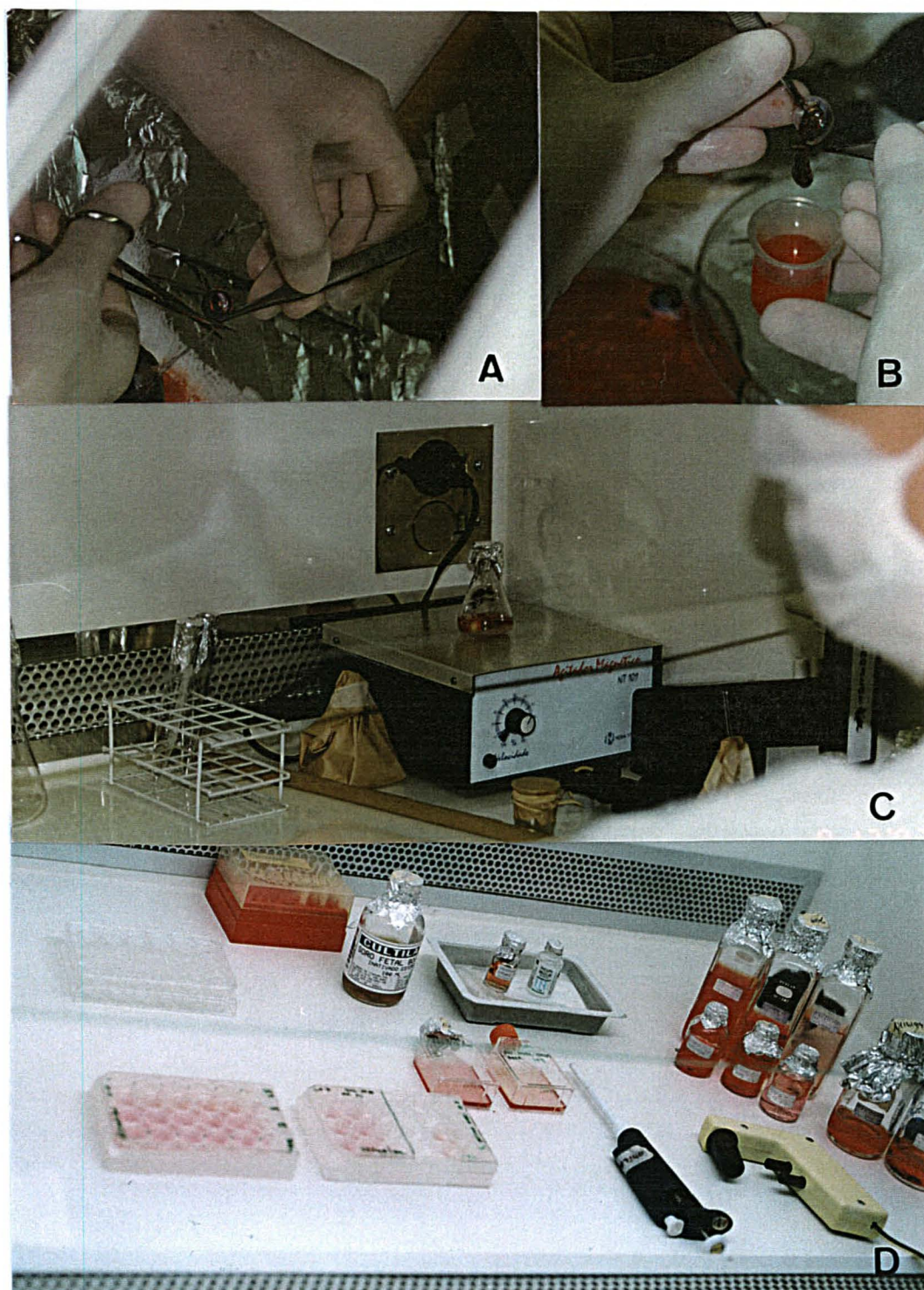


Figura 5 – Principais etapas do cultivo *in vitro* de células de peixes. A - enucleação do globo ocular. B - retirada da retina do globo ocular. C - processo de dispersão celular. D - células semeadas em microplacas e garrafas para cultivo *in vitro*.

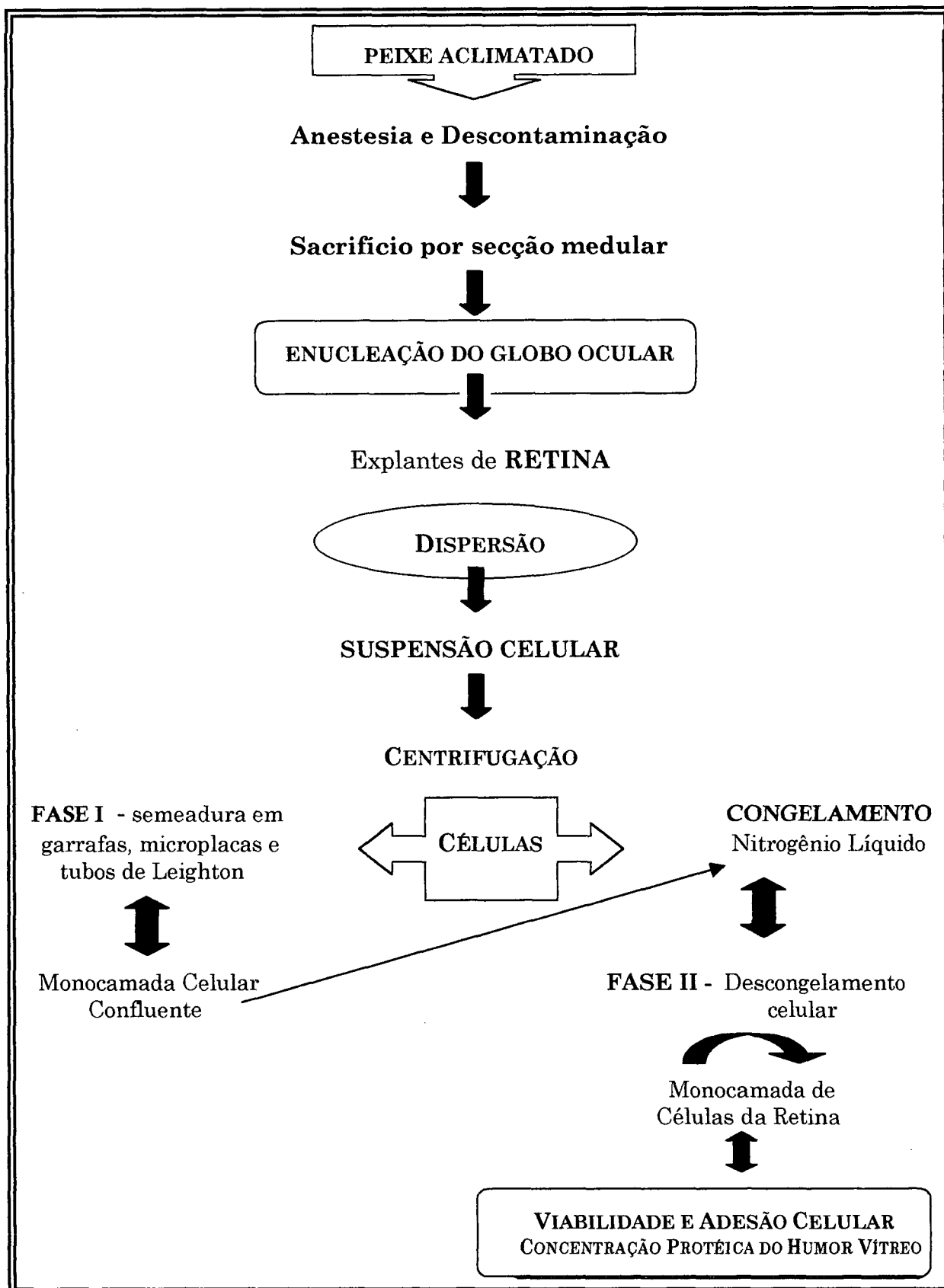


Figura 6 – Diagrama representativo das etapas executadas no projeto.

3. RESULTADOS

3.1. Efeito da temperatura sobre o cultivo *in vitro* das células da retina de peixes.

Estudo da sensibilidade térmica das células primárias de retina de peixes antárticos foi levado a efeito em meio 199 contendo soro fetal bovino 2%.

A Figura 7 mostra que a 4°C a viabilidade das células cultivadas *in vitro* é em média de 65% nas duas espécies de peixes estudadas. Ao realizar o cultivo a uma temperatura de 15°C, têm-se uma redução da viabilidade para aproximadamente 40% na *Notothenia neglecta* e 50% na *Nototheniops nudifrons* (Tabela 6).

Tabela 6 – Efeito da temperatura sobre o cultivo de células da retina de peixes antárticos.

TEMPERATURA	<i>Notothenia neglecta</i>	<i>Nototheniops nudifrons</i>
4°C (n=12)	66,04 ± 3.2	63,13 ± 4,4
15°C (n=12)	40,86 ± 3,9 *	50,0 ± 3.9*

Os dados referem-se a média ± EPM da percentagem de células viáveis de peixes antárticos.

* p<0,05 para comparação entre o grupo do cultivo à 4°C das diferentes espécies de peixes.

3.2. Efeito dos meios de cultura e de suplementos nutricionais sobre células da retina de peixes antárticos.

Na espécie de peixe *Notothenia neglecta*, o meio de cultura 199 contendo 2% de soro fetal bovino foi o que apresentou melhor resultado, onde houve um aumento da adesão celular em aproximadamente 50%, quando comparado aos

demais meios DMEM e F10. Por outro lado, a substituição do soro fetal bovino pelo humor vítreo do próprio peixe, aumentou quando comparado a estes meios, mas ao se comparar ao meio 199 contendo soro fetal bovino a adesão celular foi de aproximadamente 36% (Tabela 7).

Na espécie *Trematomus newnesi*, as células cultivadas em meio 199 contendo humor vítreo apresentou um aumento significativo de aproximadamente 43% quando comparado ao meio DMEM/SFB, e de 36% quando comparado com o meio 199 e DMEM contendo soro fetal bovino e humor vítreo respectivamente. Ao se comparar estes resultados ao meio F10 contendo humor vítreo verificamos uma redução aproximada de 15% na adesão celular (Figura 8).

Tabela 7 - Efeito dos meios de cultura e suplementos nutricionais sobre a adesão das células da retina de peixes antárticos.

MEIOS E SUPLEMENTOS	<i>Notothenia neglecta</i>	<i>Nototheniops nudifrons</i>	<i>Trematomus newnesi</i>
DMEM/SFB	61,62 ± 3,54	61,50 ± 2,51	46,40 ± 3,50
DMEM/HV	64,60 ± 3,70	56,00 ± 3,30	52,60 ± 2,39
199/SFB	95,50 ± 2,98*	75,12 ± 3,15	52,40 ± 3,24
199/HV	82,20 ± 2,67	78,60 ± 3,38	66,40 ± 2,61**
F 10/SFB	57,50 ± 1,62	81,80 ± 3,18	59,70 ± 2,76
F 10/HV	55,50 ± 3,12	85,40 ± 2,87	61,40 ± 2,61

Os dados referem-se à média ± EPM da percentagem de adesão celular.

* p < 0,05 para comparação entre os grupos do meios de cultura DMEM e F10.

** p < 0,05 para comparação entre os grupos dos meios de cultura da mesma espécie de peixe.

3.3. Concentração protéica do humor vítreo de peixes antárticos.

A concentração de proteínas totais mostrou-se significativamente maior no humor vítreo obtido do peixe *Nototheniops nudifrons* (Figura 9). Esta foi 4,2 e 1,9 % maior quando comparado à espécie *Trematomus newnesi* e *Notothenia neglecta*, respectivamente. A concentração protéica encontrada na espécie *Notothenia neglecta* foi de 2,3% maior comparado ao encontrado na espécie *Trematomus newnesi* (Tabela 8).

Tabela 8 – Concentração protéica do humor vítreo das diferentes espécies de peixes antárticos.

PEIXES ANTÁRTICOS	CONCENTRAÇÃO PROTEICA (mg/mL)
<i>Notothenia neglecta</i>	2.094
<i>Nototheniops nudifrons</i>	3.884
<i>Trematomus newnesi</i>	0.922

3.4. Viabilidade das células da retina do peixe *Notothenia neglecta* frente aos diferentes meios e suplementos utilizados.

A Figura 10 mostra o cultivo celular *in vitro*, avaliando a viabilidade celular em 3 meios de cultura diferentes, suplementados ou não com fatores de crescimento. O cultivo com meio 199 durante 24, 48 e 72 horas mostrou que a ausência ou adição de fatores de crescimento não altera a viabilidade celular, exceto por um aumento significativo de aproximadamente 50% no tempo de 24 horas com a adição do humor vítreo, quando comparado ao grupo controle. Observa-se uma prevalência do humor vítreo em manter esta viabilidade.

O meio L15 – Leibovitz, por outro lado, mostrou uma diferença significativa na viabilidade celular no tempo de 48 horas, quando comparado aos demais

grupos e esta se manteve até 72 horas, não houve diferença significativa ao comparar-se aos demais grupos.

No meio F10, todos os fatores de crescimento utilizados aumentaram a viabilidade celular em 24 e 48 horas comparado ao grupo controle. No tempo de 72 horas, interessantemente o grupo contendo insulina teve uma viabilidade igual ao grupo controle, o humor vítreo e o soro fetal bovino mantiveram a viabilidade celular neste tempo (Figura 10, Tabela 9).

Tabela 9 – Efeito dos meios de cultura e suplementos nutricionais sobre a viabilidade das células da retina do peixe *Notothenia neglecta* cultivadas *in vitro*.

MEIOS E SUPLEMENTOS	0 h	24 h	48 h	72 h
199/Controle	1391,00 ± 66,26	1054,75 ± 4,12	891,50 ± 15,02	812,25 ± 25,20
199/HV	1391,00 ± 66,26	1872,50 ± 53,15	1378,50 ± 27,18	1041,00 ± 16,45
199/ SFB	1391,00 ± 66,26	1653,75 ± 24,96	1172,75 ± 28,81	726,25 ± 28,69
199/Insulina	1391,00 ± 66,26	1470,00 ± 112,50	907,75 ± 10,37	890,00 ± 40,82
L 15/ Controle	1391,00 ± 66,26	1613,75 ± 12,50	1753,75 ± 26,08	1688,25 ± 59,82
L 15/ HV	1391,00 ± 66,26	1938,75 ± 49,05	2588,75 ± 40,03	2461,50 ± 196,56
L 15/ SFB	1391,00 ± 66,26	1698,75 ± 16,52	1923,50 ± 9,57	1913,75 ± 27,50
L 15/ Insulina	1391,00 ± 66,26	1602,50 ± 40,31	1589,75 ± 38,05	1210,25 ± 90,11
F 10/ Controle	1391,00 ± 66,26	1064,00 ± 30,84	635,75 ± 5,67	486,50 ± 33,00
F 10/ HV	1391,00 ± 66,26	1863,75 ± 11,09	1496,50 ± 10,75	1363,75 ± 36,83
F 10/ SFB	1391,00 ± 66,26	1714,50 ± 6,40	1496,50 ± 10,75	1363,75 ± 36,83
F 10/ Insulina	1391,00 ± 66,26	1850,00 ± 8,16	1605,00 ± 109,16	861,25 ± 45,53

Os dados referem-se à média ± EPM do número de células por mililitro.

3.5. Viabilidade das células da retina do peixe Trematomus newnesi frente aos diferentes meios e suplementos utilizados.

As células da retina da espécie Trematomus newnesi cultivadas nos diferentes meios de cultura com ou sem suplementos nutricionais, mostra-se com aumento significativo no tempo de 24 horas quando cultivado em meio 199 contendo os fatores de crescimento em comparação ao grupo controle. Por outro lado, o meio L15 – Leibovitz os fatores de crescimento mantiveram sua viabilidade celular com um pequeno aumento no tempo de 48 horas, não havendo diferença significativa quando comparado o meio L15 contendo soro fetal bovino ao grupo controle no tempo de 72 horas.

O meio F10 mostra um aumento na viabilidade celular com o uso dos fatores de crescimento ao tempo de 24 horas, quando comparado ao grupo controle, havendo uma redução significativa principalmente do meio contendo soro fetal bovino ao tempo de 48 horas, os demais fatores de crescimento mantiveram-se com diferença significativa frente ao grupo controle (Figura 11, Tabela 10).

3.6. Viabilidade das células da retina do peixe Nototheniops nudifrons frente aos diferentes meios e suplementos utilizados.

Na Figura 12 observa-se maior viabilidade celular no meio 199 contendo como suplemento, o humor vítreo no tempo de 24 horas, ocasionando um decréscimo significativo da viabilidade após 48 horas em cultivo, quando comparado aos demais grupos. Por outro lado, o meio L15 – Leibovitz contendo os suplementos nutricionais mantém o nível de manutenção da viabilidade celular por até 48 horas quando comparado ao grupo controle, não havendo diferenças estatísticas entre a viabilidade celular quando cultivadas com os diferentes suplementos utilizados.

No tempo de 24 horas, o humor vítreo contido no meio F10 promoveu um aumento da viabilidade ao se comparar com o grupo controle e o grupo contendo insulina, no entanto, não foi estatisticamente diferente ao se comparar ao meio contendo soro fetal bovino. O mesmo se observa às 48 horas de cultivo (Tabela 11).

Tabela 10 – Efeito dos meios de cultura e suplementos nutricionais sobre a viabilidade das células da retina do peixe *Trematomus newnesi* cultivadas *in vitro*.

MEIOS E SUPLEMENTOS	0 h	24 h	48 h	72 h
199/Controle	266,11 ± 27,13	365,71 ± 36,45	575,75 ± 22,06	122,87 ± 17,28
199/HV	266,11 ± 27,13	1460,75 ± 43,21	879,87 ± 43,14	711,42 ± 26,88
199/ SFB	266,11 ± 27,13	880,36 ± 61,11	895,00 ± 15,81	469,00 ± 22,47
199/Insulina	266,11 ± 27,13	1195,00 ± 24,58	744,66 ± 23,42	443,33 ± 32,86
L 15/ Controle	266,11 ± 27,13	492,50 ± 63,44	368,75 ± 8,54	133,33 ± 33,99
L 15/ HV	266,11 ± 27,13	1497,50 ± 29,86	1771,25 ± 70,52	925,00 ± 70,47
L 15/ SFB	266,11 ± 27,13	1325,00 ± 40,03	1327,50 ± 45,73	366,50 ± 38,59
L 15/ Insulina	266,11 ± 27,13	1350,00 ± 34,42	1565,00 ± 21,48	857,50 ± 29,86
F 10/ Controle	266,11 ± 27,13	335,00 ± 10,80	589,00 ± 8,41	144,50 ± 17,25
F 10/ HV	266,11 ± 27,13	1445,00 ± 26,46	1096,50 ± 66,50	348,25 ± 37,31
F 10/ SFB	266,11 ± 27,13	1292,50 ± 56,65	490,75 ± 76,48	216,25 ± 14,93
F 10/ Insulina	266,11 ± 27,13	1441,00 ± 32,26	1310,00 ± 29,44	180,75 ± 49,08

Os dados referem-se à média ± EPM do número de células por mililitro.

Tabela 11 – Efeito dos meios de cultura e suplementos nutricionais sobre a viabilidade das células da retina do peixe *Nototheniops nudifrons* cultivadas *in vitro*.

MEIOS E SUPLEMENTOS	0 h	24 h	48 h	72 h
199/Controle	493,00 ± 2,90	662,75 ± 30,17	654,00 ± 3,78	493,75 ± 34,00
199/HV	493,00 ± 2,90	1580,00 ± 24,49	1147,75 ± 21,14	575,75 ± 20,56
199/ SFB	493,00 ± 2,90	621,25 ± 32,75	556,00 ± 30,67	446,25 ± 65,75
199/Insulina	493,00 ± 2,90	801,25 ± 8,54	718,00 ± 7,26	547,50 ± 25,00
L 15/ Controle	493,00 ± 2,90	476,50 ± 44,97	410,00 ± 15,81	340,75 ± 34,86
L 15/ HV	493,00 ± 2,90	1085,75 ± 69,41	1008,75 ± 61,69	686,25 ± 12,50
L 15/ SFB	493,00 ± 2,90	940,00 ± 22,73	890,25 ± 87,84	612,50 ± 77,62
L 15/ Insulina	493,00 ± 2,90	923,25 ± 93,93	923,75 ± 94,46	671,25 ± 20,97
F 10/ Controle	493,00 ± 2,90	660,00 ± 57,15	518,75 ± 17,50	308,75 ± 8,54
F 10/ HV	493,00 ± 2,90	1027,50 ± 14,06	880,50 ± 20,74	584,50 ± 41,39
F 10/ SFB	493,00 ± 2,90	821,25 ± 16,52	608,25 ± 12,34	398,75 ± 32,75
F 10/ Insulina	493,00 ± 2,90	685,00 ± 42,03	667,25 ± 12,84	448,75 ± 8,54

Os dados referem-se à média ± EPM do número de células por mililitro.

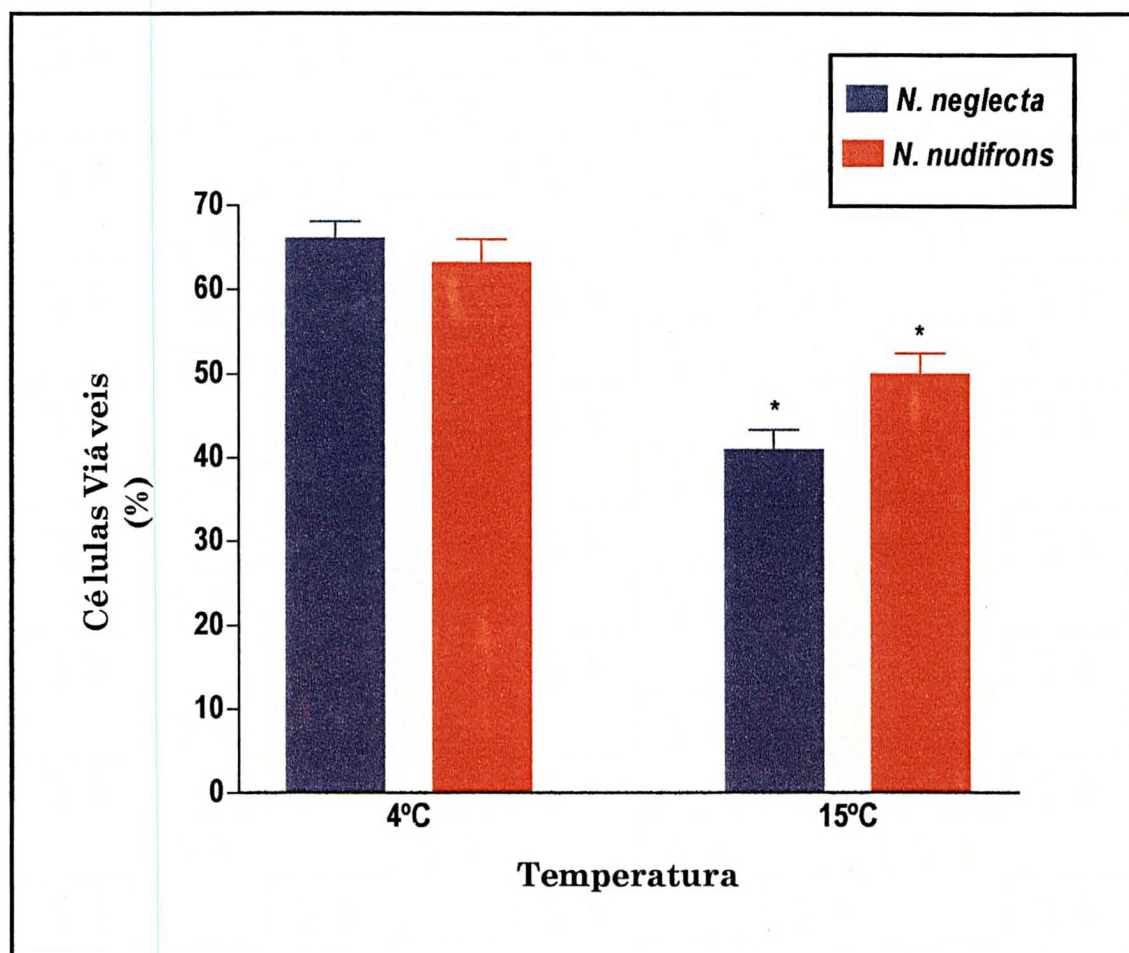


Figura 7 – Efeito da temperatura sobre o cultivo primário de células da retina de peixes antárticos, cultivadas por 24 horas em meio 199 suplementado com 2% de soro fetal bovino. Os dados representam a média \pm erro padrão da média da percentagem de células viáveis nas diferentes temperaturas de cultivo.

* Diferente significativamente quando comparado ao grupo cultivado a temperatura de 4°C ($p < 0,05$).

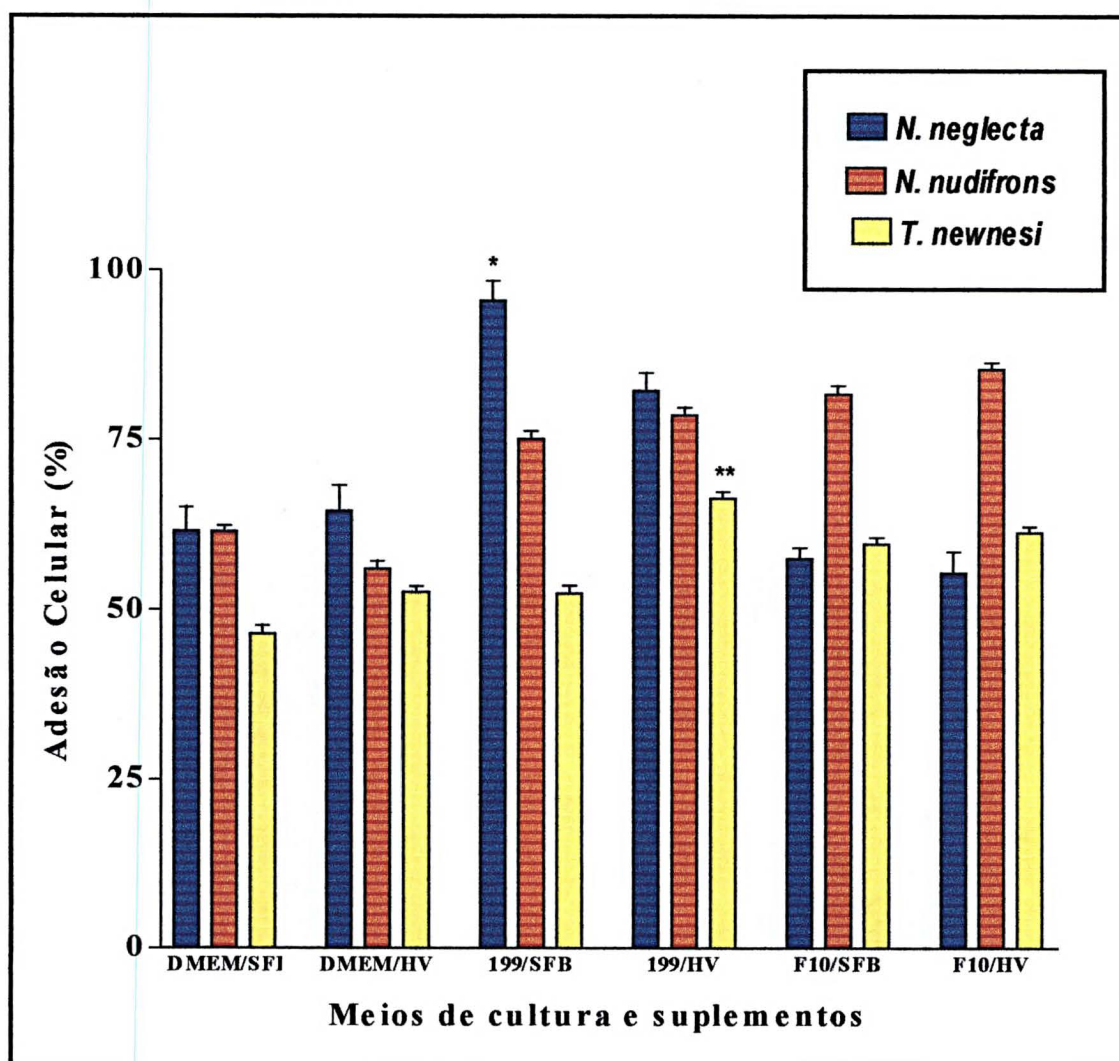


Figura 8 – Efeito dos diferentes meios de cultura suplementados com 2% de soro fetal bovino (SFB) e 2% de humor vítreo (HV), sobre células da retina de peixes antárticos, após 24 horas de cultivo *in vitro*. Fase I realizada no laboratório da Estação Antártica Comandante Ferraz. Os dados representam a média \pm erro padrão da média da percentagem de adesão celular nos diferentes meios de cultura e suplementos ($p < 0,05$).

* Diferente significativamente quando comparado ao grupo cultivado com meio DMEM e F10

** Diferente significativamente quando comparado ao grupo cultivado os outros meios.

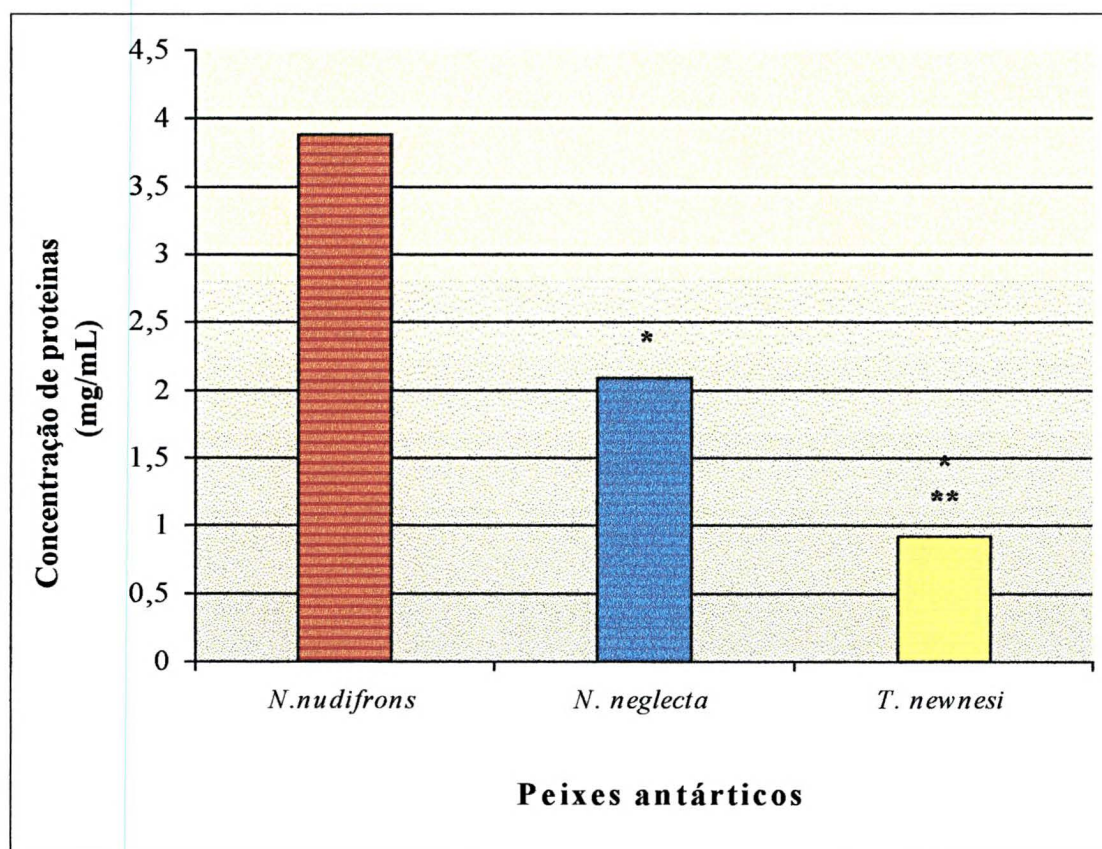


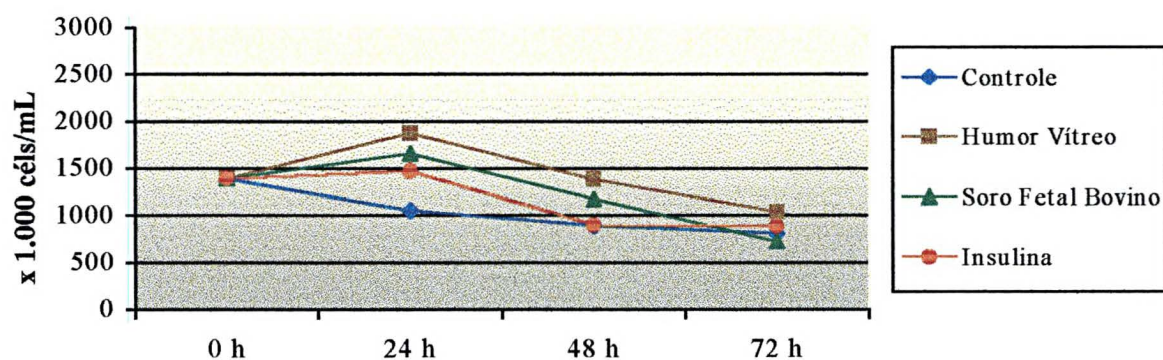
Figura 9 - Concentração protéica do humor vítreo das diferentes espécies de peixes Antárticos.

* Diferente do grupo da espécie de peixe *Notothernia nudifrons*.

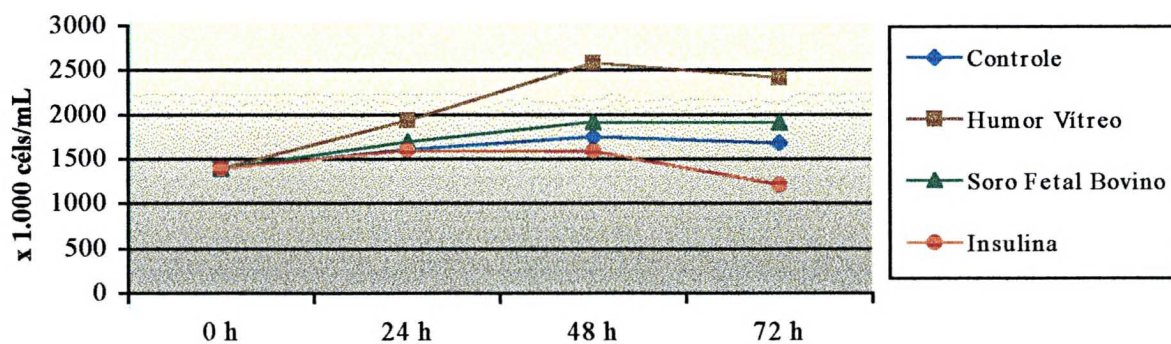
** Diferente dos grupo das espécies *Nototherniops nudifrons* e *Notothernia neglecta*.

Viabilidade celular – *Notothenia neglecta*

MEIO 199



MEIO LEIBOVITZ (L-15)



MEIO F-10

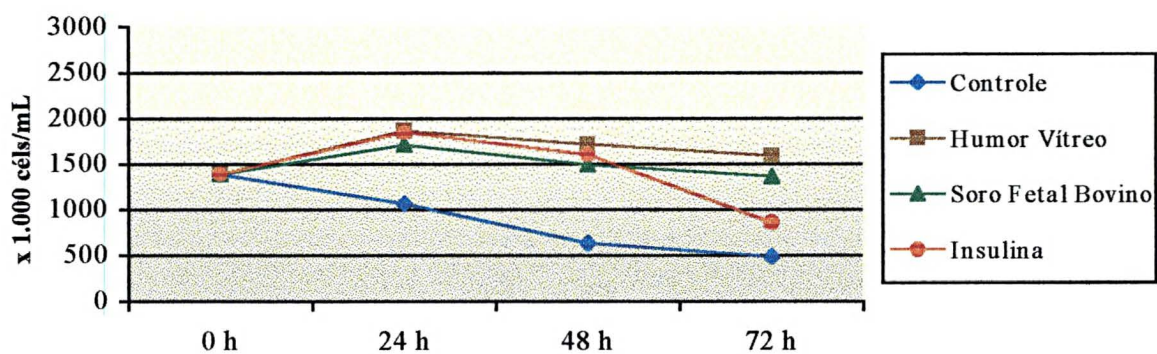
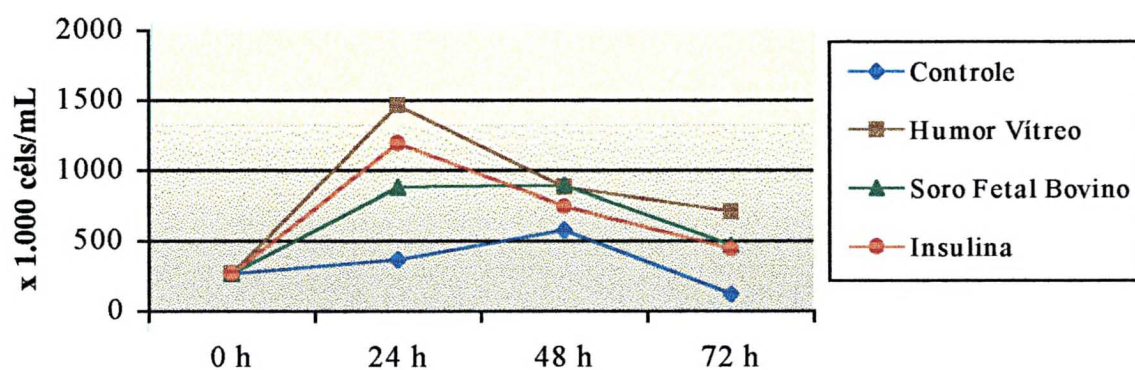


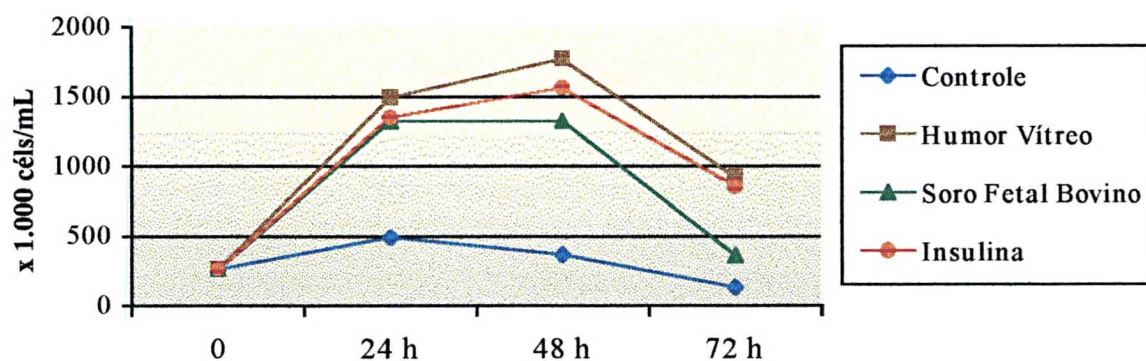
Figura 10 - Efeito dos meios de cultura 199, L 15 - Leibovitz e F 10 suplementados com humor vítreo, soro fetal bovino e insulina, sobre células da retina do peixe *Notothenia neglecta* cultivadas *in vitro*.

Viabilidade celular – *Trematomus newnesi*

MEIO 199



MEIO LEIBOVITZ (L-15)



MEIO F-10

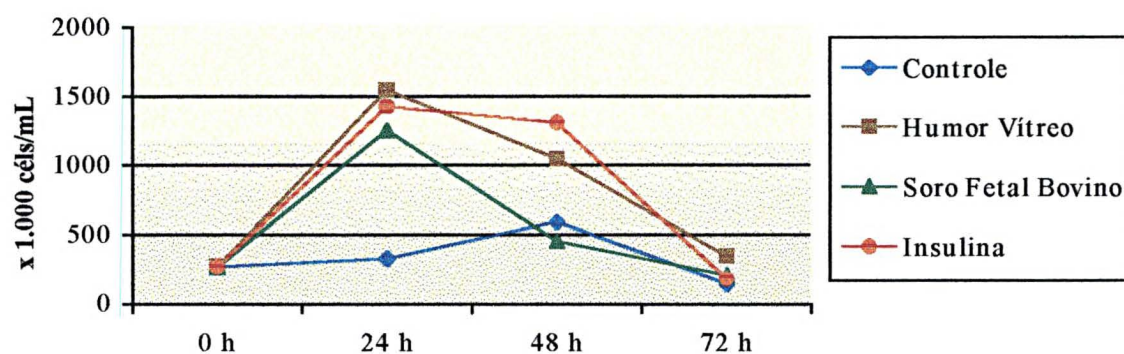


Figura 11 - Efeito dos meios de cultura 199, L 15 - Leibovitz, F10 suplementados com humor vítreo, soro fetal bovino e insulina sobre a viabilidade das células da retina do peixe *Trematomus newnesi* cultivadas *in vitro*.

Viabilidade celular – *Nototheniops nudifrons*

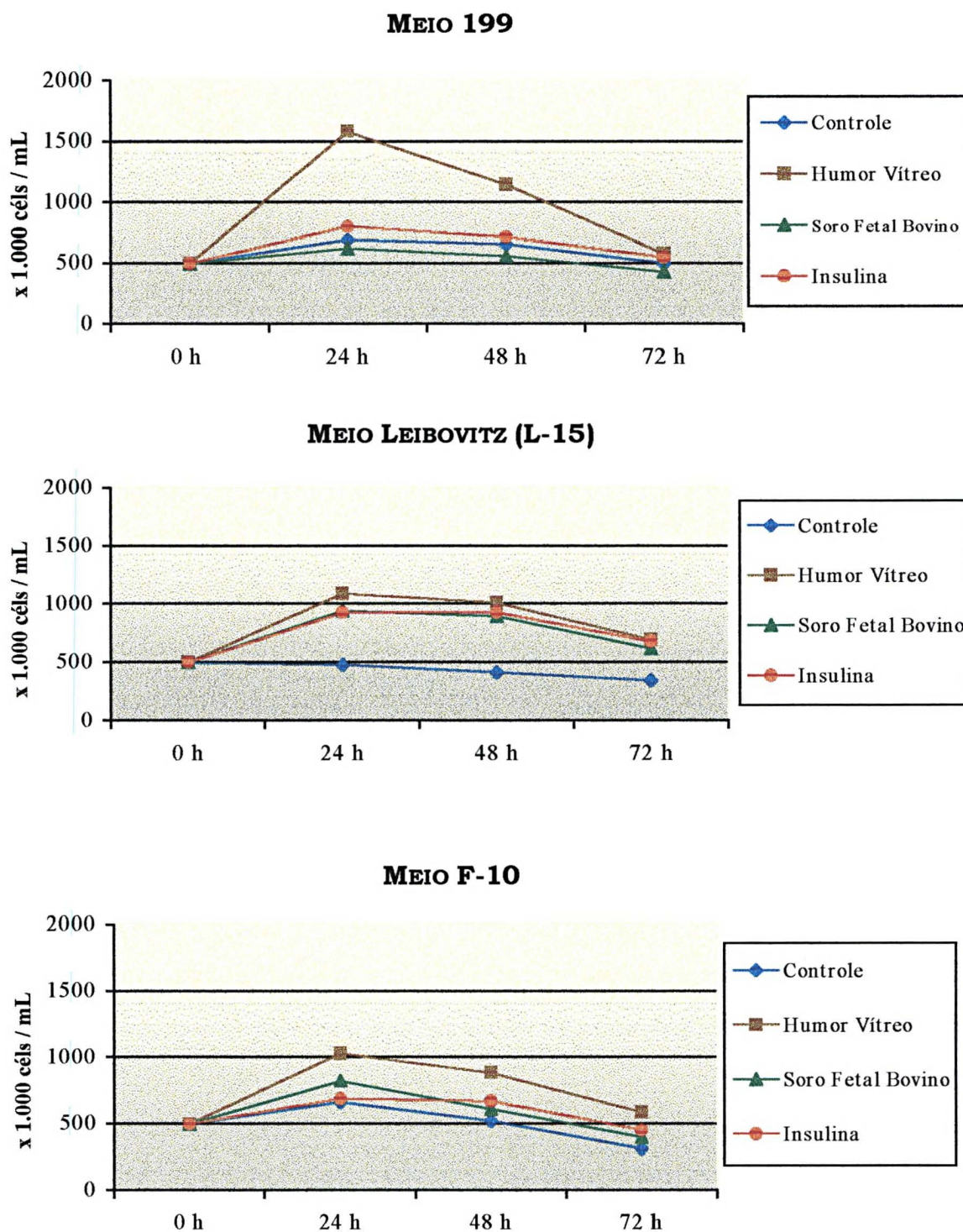


Figura 12 - Efeito dos meios de cultura 199, L 15 - Leibovitz e F10, suplementados com humor vítreo, soro fetal bovino e insulina, sobre a viabilidade das células da retina do peixe *Nototheniops nudifrons*, cultivadas *in vitro*.

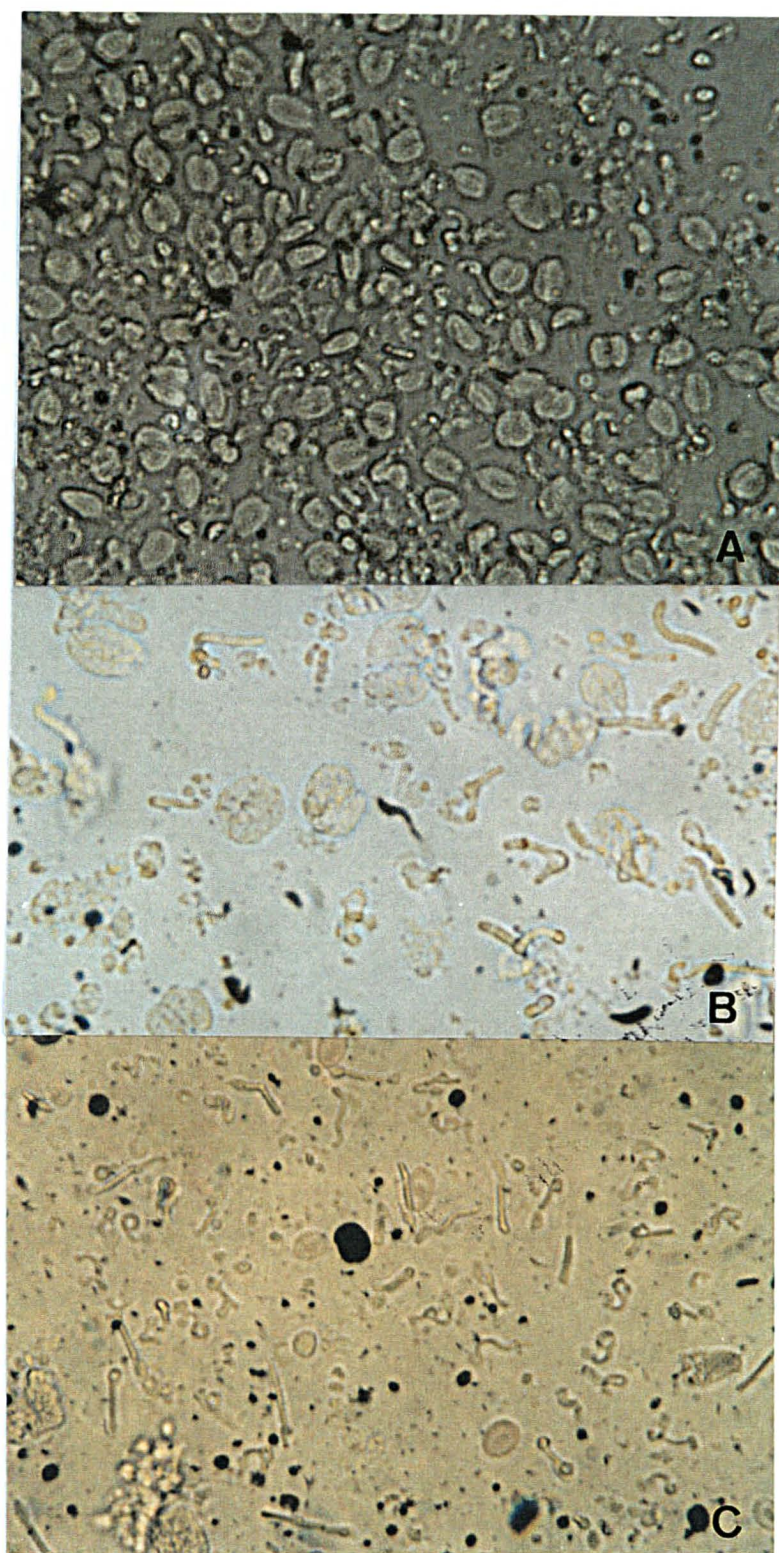


Figura 13 – Cultivo em monocamada de células da retina de *Nototheniops nudifrons*. A - células em crescimento após 24 horas de cultivo em meio L15 - Leibovitz suplementado com insulina (5 μ g/mL). B e C - células em crescimento no meio L15 - Leibovitz com soro fetal bovino 2% após 24 e 48 horas respectivamente.

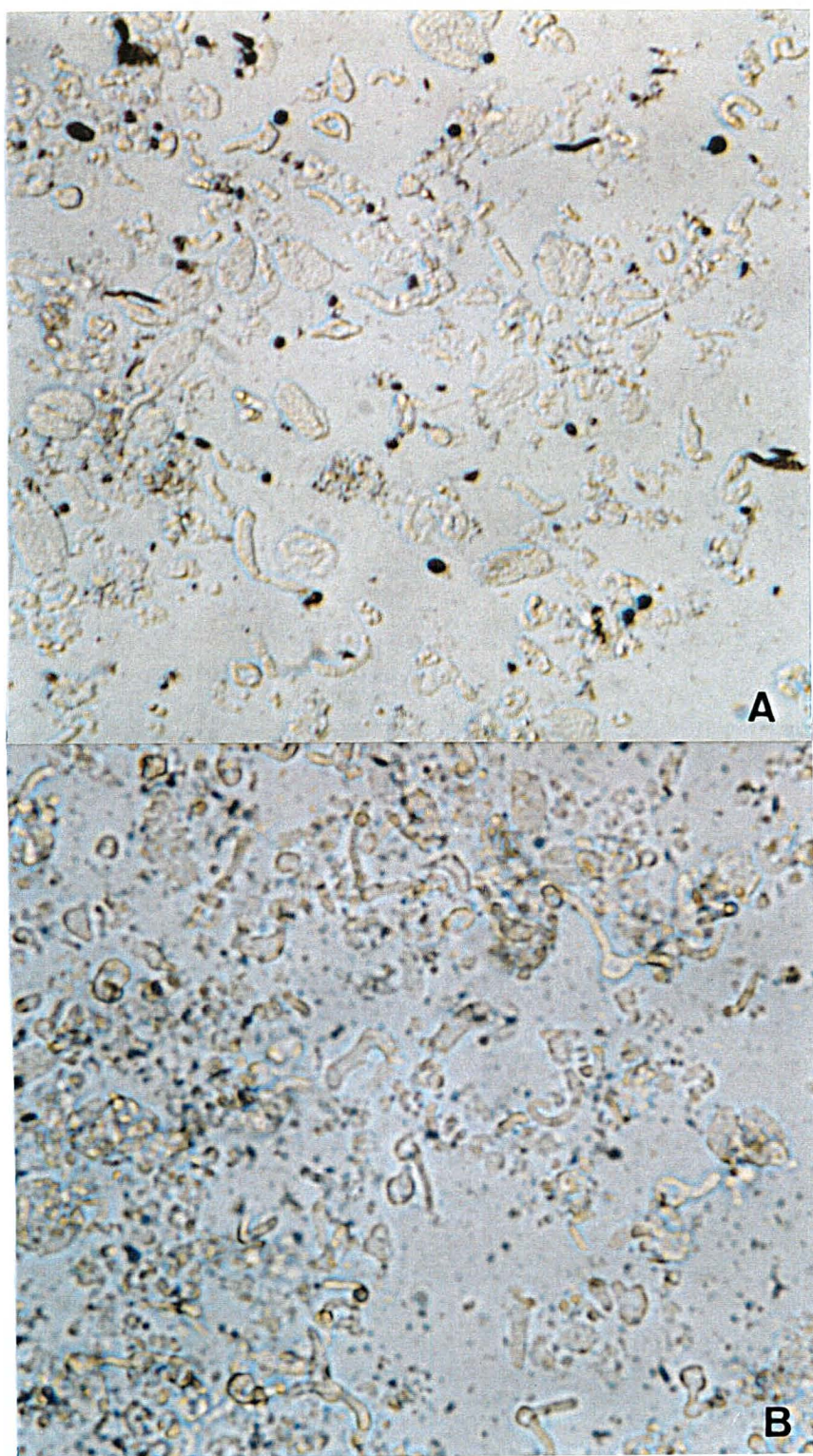


Figura 14 – Cultivo em monocamada de células da retina de *Trematomus newnesi*. A - crescimento celular após 24 horas em meio 199 com 2% soro fetal bovino. B - crescimento celular após 24 horas em meio 199 contendo humor vítreo 2%.

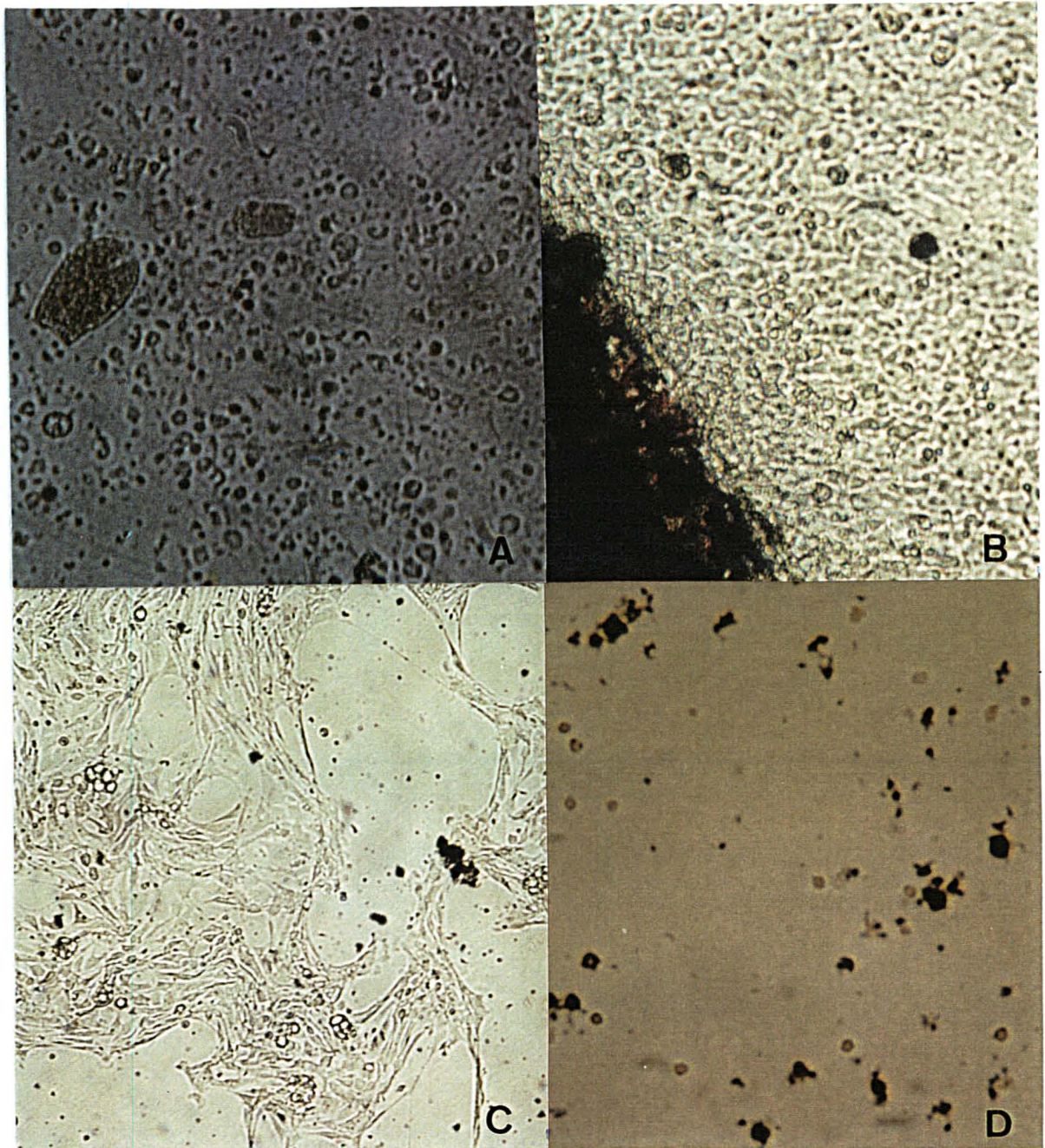


Figura 15 – Cultivo em monocamada de células da retina de *Notothenia neglecta*. A - cultivo após 24 horas em meio L 15 - Leibovitz contendo 2% de humor vítreo. B - explante de tecido da retina cultivado em meio L 15 - Leibovitz contendo 2 % de humor vítreo após 24 horas. C - explante de retina após 7 dias. D - tipos distintos de células horizontais diferenciadas em cultivo após 8 dias.

4. DISCUSSÃO

Os peixes vivem em ambientes com iluminação muito variada, assim como outros grupos de vertebrados. A quase totalidade das pesquisas em torno da retina destes animais são centradas em estudos de sua histologia, mas há interesse da parte de pesquisadores em estudar as correlações entre o número e as características das células da retina em diferentes espécies de peixe. Os estudos comparativos da retina de teleósteos marinhos foram iniciados por ALY & HANYU em 1963 citado por KOHBARA *et al.*, (1987). Tais estudos relatam somente dados sobre a morfologia da retina e sua variação estrutural, em relação à profundidade do habitat e seu significado funcional.

Neste âmbito científico, o presente projeto possui características mais aprofundadas, podendo dar suporte para pesquisas futuras na descoberta de aspectos mais abrangentes do ponto de vista bioquímico de espécies de peixes ambientados em condições biológicas extremas.

De acordo com os resultados do presente trabalho, o processo de multiplicação celular do tecido retiniano de peixe ocorre também *in vitro*, um fato certamente muito relevante para estudos de comportamento bioquímico e fisiológico dessa importante estrutura biológica. Além disso, certos aspectos de alterações celulares podem estar relacionada com a própria regeneração celular.

As células ganglionares, em cinco a oito dias de cultivo, apresentam corpos celulares grandes através de vários processos de diferenciação. Ao mesmo tempo, outras células revelam alguns corpos celulares distintos e evidentes (Figura 15 D), isso pode estar associado com a degeneração celular, ou com a apoptose, muitas vezes provocada em modelos *in vitro* pelas condições fisiológicas dos meios ou dos nutrientes basais adicionados.

Nos estudos de viabilidade celular realizados com células da retina de peixes utilizou-se a metodologia tradicional de contagem celular em câmara de Neubauer. As células de peixes diferem, na intensidade de adesão, de acordo com o tecido, órgão e o substrato utilizado. Em parte, esses reflexos diferem também entre linhagens celulares nas condições de cultura, meio e temperatura, afetando ou dificultando as células a se dispersarem e aderirem à superfície dos frascos. Por este motivo, o objetivo principal deste estudo foi otimizar as condições de meios de cultura para estas células em diferentes espécies de peixes antárticos através da avaliação do comportamento celular em função do meio de cultura (DMEM, L15, F10 e 199) e seus suplementos (soro fetal bovino, insulina e humor vítreo), com base na viabilidade celular e sua adesão sobre o substrato.

Os efeitos de alguns meios de cultura em células da retina de peixes antárticos foram avaliados através da adesão celular e da viabilidade, com a adição de suplementos nutricionais, como o soro fetal bovino e o humor vítreo, em diversas concentrações. Em um experimento base, realizado nos laboratórios da Estação Antártica Comandante Ferraz, verificou-se que uma quantidade maior na concentração de soro fetal bovino pode ser prejudicial ao cultivo, pois o estímulo requerido para uma proliferação celular deve ser padronizado de acordo com as respostas celulares. Entretanto, a utilização de soro fetal bovino a 2% tornou-se básico no cultivo de células da retina de peixes antárticos, fato que, comprova relatos de alguns trabalhos científicos na área.

São várias as técnicas para a avaliação, do número de células viáveis em cultura de monocamada, muitas com suas vantagens e desvantagens, incluindo a rapidez e sensibilidade do processo. Sistemas celulares possuem importantes limitações. Em alguns casos, as células adultas não sobrevivem em cultura, necessitando do uso de tecidos jovens que podem ter susceptibilidade diferente para a ação inibitória de fatores que podem afetar esse processo, comparados com células adultas (MC DONALD & JOHNSTON, 1990). Em algumas espécies de peixes antárticos, foi possível notar o fato de que, células mais jovens proliferam

com maior facilidade do que as células obtidas de animais adultos, mesmo no caso da retina onde existe uma regeneração celular constante. As células da retina do peixe *Trematomus newnesi* apresentaram um crescimento menor em relação as demais espécies de peixes, independente dos meios de cultura e dos suplementos utilizados. As células dos peixes das espécies *Nototheniops nudifrons* e *Notothenia neglecta* apresentaram uma maior eficiência no crescimento, provavelmente pelo fato das células terem sido obtidas de animais jovens (Tabela 6, Figura 7).

Pesquisas na área de caracterização de interações locais da retina, e na identificação de fatores de crescimento, envolvidos no desenvolvimento dessas células, motivam e destinam-se a compreender mecanismos do desenvolvimento do sistema nervoso. Os dados obtidos neste trabalho, em um contexto geral, deixam patente as prováveis semelhanças que possam estar ocorrendo com a simples adição ou ausência de meios e suplementos em cultivo *in vitro*, podendo levar a mecanismos de morte celular natural ou por apoptose. Esses processos de degeneração celular estudados através de métodos especiais são o alvo de muitas substâncias descobertas, através até mesmo da liberação em cultivo de fatores de crescimento, depositando com isso os interesses dentro da biotecnologia, na probabilidade de se utilizar tais fatores em tratamento de doenças degenerativas (ARAÚJO & LINDEN, 1990; LINDEN, 1993).

A eliminação de certos componentes ou a adição de outros, tem gerado uma problemática na metodologia de cultivo celular, e a necessidade do desenvolvimento de procedimentos alternativos para distribuir nutrientes essenciais e estabilizar o microambiente extracelular, contra flutuações do pH, de proteólise, etc., levando a uma diversidade de métodos alternativos que permite, através de avaliações quantitativas de uma mistura complexa, identificar o nutriente mais adequado para determinado tecido ou célula. Essas determinações sugerem que os requerimentos nutricionais variam consideravelmente entre tipos celulares e entre espécies animais.

A substituição do soro nos meios de cultura sintéticos é muitas vezes otimizado, facilitando a adição de aminoácidos, carboidratos, entre outros suplementos requeridos para uma variedade de tipos celulares (JAYME, 1991).

A percentagem de adesão das células da retina de peixes, apresentou melhores resultados com uso do meio 199 num período de tempo de 24 horas, tanto com soro fetal bovino quanto com humor vítreo, pois além da composição do meio apresentar variação no teor de vitaminas, aminoácidos e tampão fosfato (Tabelas 1, 2, 3 e 5) permite maior estabilidade do pH do meio.

Pelos valores obtidos nos experimentos, a percentagem de células viáveis também foi influenciada pela temperatura, apresentando aumento do número de células viáveis em cultivo com a diminuição da temperatura (4°C). Por outro lado, as células cultivadas em temperatura de 15°C e, em um caso excepcional, a 22°C, mostraram células em fase degenerativa, após 24 horas de cultivo, demonstrando que a temperatura exerce influencia nas condições básicas de cultivo das células de peixes antárticos, os quais vivem ambientados em temperaturas extremamente baixas. A Figura 7 mostra a relação que existe entre a temperatura e a viabilidade celular nas diferentes espécies de peixes antárticos cultivadas por um período de 24 horas.

A glicose, por suas características bioquímicas e metabólicas, é um nutriente fundamental nas formulações dos meios de cultura, podendo ser substituída pela galactose em situações onde o acúmulo de lactato deva ser evitado, como provavelmente ocorra no caso das células da retina, fato que se traduz por aumento da densidade celular (JAYME, 1991). Este fato foi possível de verificar nos resultados com células cultivadas em meio L-15 - Leibovitz que possui galactose ao invés de glicose em sua formulação (Tabela 4).

A densidade celular pode ser dispersada em muitos casos, através do uso de tripsina combinada com quelante (EDTA), em células da retina. O uso da tripsina no cultivo das células da retina de peixes, apresentou alto índice de

células mortas, passando-se a utilizar dispersão mecânica nos cultivos celulares, até mesmo, porque o tecido é extremamente frágil e de fácil manipulação.

Amostras das células da retina de peixes antárticos preservadas em nitrogênio líquido, em meios contendo DMSO ou glicerina (10%) foram descongeladas obtendo-se grande índice de células viáveis. Aliás, toda a pesquisa realizada na fase 2 deste trabalho, exigiu a etapa de descongelamento do material oriundo da Antártica. Os ensaios preliminares foram realizados em campo, onde se caracterizou alguns meios e a temperatura de cultivo. O uso do humor vítreo como suplemento surgiu da necessidade de um novo “fator de crescimento” pela falta de opções encontradas no laboratório da EACF.

O fato de se ter utilizado o humor vítreo do próprio animal como “fator de crescimento”, em meio de cultura de células da retina, pode vir a ser um dos motivos de pesquisas mais avançadas na investigação direta da manutenção natural da retina. Não foram encontrados relatos do uso deste suplemento em publicações de cultivos celulares e sabe-se que muitas descobertas a esse nível se desenvolveram, chegando ao uso terapêutico, como foi o caso da Miotrofina, um fator neurotrófico semelhante ao IGF-1 que impede a degeneração dos neurônios motores da mesma forma que os estudos experimentais realizados em laboratório, retardando ou bloqueando o progresso da doença.

Apesar dos resultados muito animadores, aliás, das pesquisas aqui mostradas, há certamente, ainda muitos obstáculos a serem vencidos até que se atinja um nível experimental do emprego da metodologia em estudo na rotina aplicada. Esta expectativa pode uma vez ser superada através de estudos a partir de um meio definido para a proliferação e manutenção das células por tempo mais prolongado, para que se possa investigar também o uso de drogas que possam interferir com as interações celulares de natureza neurotrófica. A utilização destes suplementos e meios de culturas com diferentes composições,

são executados inicialmente em culturas primárias, podendo posteriormente utilizar-se de células de linhagens mantidas em laboratório para comparação.

As indagações no que tange os estudos sobre o desenvolvimento, a manutenção e a diferenciação das células retinianas, certamente serão motivos de estímulo para o aprofundamento do conhecimento científico em tão importante pesquisa biológica. Estes estudos, tanto no que diz respeito à retina de peixes como de outras espécies animais, são essenciais para a compreensão da ação de algumas moléculas fundamentais do sistema visual e consequentemente do sistema nervoso, podendo permitir sua utilização, como é o caso do humor vítreo, que de acordo com dados do presente trabalho mostra de extrema importância como material biológico fundamental em estudos *in vitro* de células da retina.

É provável que no futuro, o desenvolvimento de meios nutritivos adicionados de uma gama de suplementos diferenciados, possam ser previstos, com formulações definidas para uma ampla classe de tipos celulares, e com isso, a descoberta de tratamentos que impeçam a degeneração e a morte de células lesadas, podendo ainda, reativar ou mesmo estimular mecanismos naturais interrompidos por determinadas doenças.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados no presente trabalho, podemos concluir que:

1. As células da retina, quando cultivadas à temperatura de 15°C ou superior, degeneram após 24 horas, demonstrando que a temperatura influi nas condições básicas de cultivo das células de peixes antárticos, os quais vivem ambientados em temperaturas extremamente baixas, sendo que, 4°C foi a temperatura ideal para o crescimento e manutenção destas células.
2. Células da retina de algumas espécies de peixes antárticos, quando cultivadas em distintos meios de cultura contendo suplementos nutricionais, apresentam diferenças na viabilidade e adesão celular. O meio DMEM foi menos viável para o cultivo destas células, ao contrário dos meios 199, L15 - Leibovitz e F10.
3. O humor vítreo como suplemento em meios de cultura para células da retina de peixes, influenciou de modo positivo na viabilidade celular, independente do meio utilizado, mostrando-se excelente material biológico para o crescimento destas células.
4. O aumento da sobrevida das células da retina de peixes cultivadas em meios Leibovitz (L15), sugere indicações de que este possui condições básicas de nutrientes que podem mantê-las em cultivo por um período maior de tempo, sendo que o cultivo em meio 199, independente do suplemento e das espécies de peixes estudadas, as células da retina mostram um pico de crescimento máximo em 24 horas de cultivo, degenerando em seguida.
5. A concentração de proteínas totais no humor vítreo, principalmente em maior quantidade na espécie *Notototheniops nudifrons*, pode estar influenciando como fator de crescimento nos meios de cultura.

6. Pode estar ocorrendo uma “autodestruição celular” também denominada apoptose nas células retinianas, em algumas condições básicas de cultivo relacionadas à suplementação, principalmente do soro fetal bovino e da insulina após um determinado tempo de cultivo, podendo ser responsável pela diferenciação celular em alguns casos.
7. Independente do tipo celular ou do tecido utilizado, as células em cultivo respondem aos diversos meios e aos fatores de crescimento a eles adicionados, indicando que o processo de manutenção das células *in vitro* é complexo. Ademais, os protocolos expostos neste estudo serão investigados profundamente, em seus aspectos bioquímicos em estudos comparativos entre peixes antárticos e peixes adaptados a regiões tropicais.
8. São necessários estudos sobre interações celulares e sua correlação com eventos no seu desenvolvimento e manutenção celular, para compreender melhor a ação destas substâncias, buscando muitas ações biológicas e a sua utilização de forma responsável.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARAUJO, E. G.; LINDEN, R. Survival of retinal ganglion cells *in vitro*: The effects of conditioned medium from retinal cell aggregates. **Brazilian J. Med. Res.**, **23**: 743-746, 1990.
2. AKAGAWA, K.; BARNSTABLE, C. J. Identification and characterization of cell types in monolayer cultures of rat retina using monoclonal antibodies. **Brain Research**, **383**: 110-120, 1986.
3. BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification on microgram quantities of protein utilizing the principle-dye binding. **Anal. Biochem.**, **72**: 248, 1976.
4. CHENG, L. L.; BOWSER, P. R.; SPITSBERGEN, J. M. Development of cell cultures derived from lake trout liver and kidney in a hormone-supplemented, serum-reduced medium. **Journal of Aquatic Animal Health**, **5**: 119-126, 1993.
5. DELFINO, A. B. M.; BARRETO, E. C.; SILVA JR., E. T.; MENDONÇA, R. G.; ORNELLAS, M. H. O envolvimento de genes e proteínas na regulação da apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia** **43 (3)**: 1997.
6. DOWLING, J. E.; LASATER, E. M.; VAN BUSKIRK, R.; WATLING, K. J. Pharmacological properties of isolated fish horizontal cells. **Vision Res.**, **23(4)**: 421-432, 1983.

7. DOWLING, J. E.; PAK, M. W.; LASATER, E. M. White perch horizontal cells in culture: methods, morphology and process growth. **Brain Research**, **360**: 331-338, 1985.
8. DUNLAP, W. C.; WILLIAMS, D. Mc.; CHALKER, B. E. & BANASZAK, A. Biochemical photoadaptation in vision: U.V. absorbing pigments in fish eye tissues. **Comp. Biochem. Physiol.** **93 B (3)**: 601-607, 1989.
9. EAGLE, H. Media for animal cell culture. **Tissue Culture Association Manual**, **3**: 517-529, 1976.
10. FISCHER, W.; HUREAU, J. C. Fao species identification sheets for fishery purposes. southern ocean, **CCAMLR Convention Area 2**: 233 – 477, 1985.
11. FRYER, J. L.; YUSHA, A.; PILCHER, K. S. The *in vitro* cultivation of tissue and cells of Pacific salmon and steelhead trout. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** **126**: 566-586, 1965.
12. FUHRMANN, S.; KIRSH, M.; HOFMANN, H. D. Ciliary neurotrophic factor promotes chick photoreceptor development in vitro. **Development**, **121**: 2695-2706, 1995.
13. GRÜTZNER, L. Experiments on the culture of the tissues of *Macropodus opercularis* (Linné) and *Lebistes reticulatus* (Peters) *in vitro*. **Zentr. Bakteriolog.** **165**: 8-24, 1956.
14. GRÜTZNER, L. In vitro – züchtung pes leber-und nierengewebes von *Tinca vulgares* Cuv. (Schleie) in trypsinierten einschichtgewebekulturen. **Zentr. Bakteriolog. Parasitenk Abt. I. Orig.** **173**: 195-202, 1958.

15. HAGEDORN, M.; MACK, A. F.; EVANS, B. FERNALD, D. R. The embryogenesis of rod photoreceptors in the teleost fish retina *Hapochromis burtoni*. **Brain Res. Dev.** **108 (1-2):** 217- 27, 1998.
16. HICKS, D.; COURTOIS, Y. Fibroblast growth factor stimulates photoreceptor differentiation in vitro. **J. Neuroscience**, **12:** 2022-2033, 1992.
17. HIGHTOWER, L. E.; RENFRO, L. Recent applications of fish cell culture to biomedical research. **The Journal of Experimental Zoology**, **248:** 290-302, 1988.
18. JAYME, D. W. Nutrient optimization for high density biological production applications. **Cytotechnology**, **5:** 15-30, 1991.
19. JULIAN, D.; ENNIS, K. & KORENBROT, J. I. Birth and fate of proliferative cells in the innernuclear layer of the mature fish retina. **J. Comp. Neurol.** **394 (3):** 271-82, 1998.
20. KELLEY, M. W.; TURNER, J. K.; REH, T. A. Retinoic acid promotes differentiation of photoreceptors in vitro. **Development**, **120:** 2091-2102, 1994.
21. KOHBARA, J.; NIWA, H.; OGURI, M. Comparative light microscopic studies on the retina of elasmobranch fishes. **Nippon Suisan Gakkaishi** **53(12):** 2117-2125, 1987.
22. LAM, M. K. D.; AYOUB, G. S. Biochemical and biophysical studies of isolated horizontal cells from the teleost retina. **Vision Res.** **23(4):** 433-444, 1983.

23. LEIBOVITZ, A. The growth and maintenance of tissue/cell cultures in free gas exchange with the atmosphere. **Amer. J. Hyg.** **78**: 173-180, 1963.
24. LINDEN, R. Fatores neurotróficos: moléculas de vida para células nervosas. **Ciência Hoje**, **16(94)**: 13-18, 1993.
25. LINDEN, R.; CHIARINI, L. B. Nuclear exclusion of transcription factors associated with apoptosis in developing nervous tissue. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **32(7)**: 813-820, 1999.
26. LOPÉZ-COLOMÉ, A. M.; ROMO DE VIVAR, M.; Serum affects the characteristics of excitatory amino acid-binding sites on Müller cells. **Neurosc. Res.** **25 (1)**: 25 - 32, 1996
27. MACK, A. F.; FERNALD, R. D. Regulation of cell division and rod differentiation in the teleost retina. **Development Brain Research**, **76**: 183-187, 1993.
28. MACK, A. F.; FERNALD, R. D. Thin slices of teleost retina continue to grow in culture. **Journal of Neuroscience Methods** **36(2-3)**: 195-202, 1991.
29. MAJIMA, K. Presence of growth factor in human vitreous. **Ophthalmologica**, **211**: 226-228, 1997.
30. MC DONALD, J.; JOHNSTON, M. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. **Brain Research**, **15**: 41-70, 1990.

31. MACDONALD, J. A.; MONTGOMERY, J. C. The sensory biology of notothenioid fish. In: **Biology of antarctic fish**, 145-152, 1990.
32. MORGAN, J. F., CAMPBELL, E.; MORTON, H. J. The nutrition animal tissues cultivated in vitro. I. A survey of natural materials as supplements to synthetic medium. **J.N.C.I.** **16(2)**: 557-567, 1955.
33. PHAN, M. T. Histologia da retina de peixes antárticos do estreito de Bransfield. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, **58 (Supl.)**: 35-42, 1986.
34. PHAN, M. T.; NACHI, A. M. Antarctic fish retina. Histiological variations under continuous darkness. **Pesquisas Antárticas Brasileiras**, **2 (1)**: 7-11, 1990.
35. REHEN, S. K.; ARY-PIRES, R.; LINDEN, R. Intraretinal neurotrophic activity prevents the degeneration of ganglion cells in retinal explants. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, **26**: 955-959, 1993.
36. SCHWARTZ, L.; OSBORNE, B. A. Cell death: **Methods in Cell Biology**. Academic Press, USA, 1995. p. 01-38.
37. SHIGEHICO, K.; MORGAN, J.; CAPRIOLI, J. Hipoxic and excitotoxic damage to cultures rat retinal ganglion cells. **Exp. Eye. Res.** **63**: 105-112, 1996.
38. SIGEL, M. M.; BEASLEY, A. R. Marine teleost fish tissues In: **Tissue Culture Methods and Applications**. Academic Press, New York, 1973. p. 133-135.

39. SPRADA MAIA, E. R.; MIKITO, L. B.; BACILA, M. Alterações dos clorofenoxiacetatos sobre o metabolismo de células *in vitro* de peixes marinhos e de água doce. **II Simpósio sobre Ciências Médicas e Biológicas**, Curitiba, 1995.
40. SPRADA MAIA, E. R.; SALVO, L. M.; MIKITO, L. B.; BACILA, M.; Estudos bioquímicos e fisiológicos de células de peixes da família *Cichlidae* em cultivo. **Arquives of Veterinary Science**, **I(1)**: 69, 1996.
41. SPRADA MAIA, E. R.; WOEHLE, O. M.; CARDOSO, F.; BACILA, M. Avaliação *in vitro* de meios de cultura sobre o crescimento de células da retina de peixes antárticos. **XVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**, Fesbe, Caxambú, 1998.
42. SRIVASTAVA, A. K. Use of pharmacological agents in elucidating the mechanism of insulin action. **TIPS**, **19**: 205-209, 1998.
43. STRAUSS, D. S. Growth stimulatory actions of insulin in vitro and in vivo. **Endocr. Rev.**, **5**: 356-69, 1984.
44. WÖEHL, O.; SPRADA MAIA, E. R.; BACILA, M. Caracterização *in vitro* de células da retina de *Chaenocephalus aceratus* – Família Chaenichthyidae. **Arquives of Veterinary Science**, **2 (Supl)**: 81, 1997.
45. WOLF, K.; DUNBAR, C. E. Cultivation of adult teleost tissues *in vitro*. **Proc. Soc. Expl. Biol. Med.**, **95**: 455-457, 1957.
46. WOLF, K. & MANN, J. A. Poikilotherm vertebrate cell lines and viruses: A current listing for fishes. **In vitro**, **16**: 168-179, 1980.

47. WOLF, K.; QUIMBY, M.C. Fish cell and tissue culture. **Fish Physiology**, **3**: 253-305, 1969.
48. WOLF, K.; QUIMBY, M. C. Procedures for subculturing fish cells and propagating fish cells lines. **Tissue Culture Association Manual 2(4)**: 271-274, 1976.
49. ZHAO, S.; BARNSTABLE, C. J. Differential effects of bFGF on development of the rat retina. **Brain Research**, **723**: 169-176, 1996.